

SÉRIE A, N° 1352

N° D'ORDRE :

2221

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

André LWOFF

Docteur en Médecine
Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur de Paris

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES BIOCHIMIQUES SUR LA NUTRITION DES PROTOZOAIRES. LE POUVOIR DE SYNTHÈSE.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 11 mars 1932 devant la Commission d'examen.

MM. CAULLERY.....	Président.
MOUTON.....	} Examineurs
COMBES.....	

PARIS

MONOGRAPHIES DE L'INSTITUT PASTEUR
MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

1932

SÉRIE A, N° 1352

N° D'ORDRE :

2221

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

André LWOFF

Docteur en Médecine

Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur de Paris

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES BIOCHIMIQUES SUR LA NUTRITION DES PRO-
TOZOAIRES. LE POUVOIR DE SYNTHÈSE.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le mars 1932 devant la Commission d'examen.

MM. CAULLERY.....	Président.
MOUTON.....	} Examinateurs
COMBES.....	

PARIS

MONOGRAPHIES DE L'INSTITUT PASTEUR

MASSON ET Cie, ÉDITEURS

1932

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen..... C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du globe.

Doyen honoraire.... M. MOLLIARD.

<i>Profess. honoraires.</i>	{	H. LE CHATELIER.	E. HEROUARD.
		H. LEBESGUE.	EMILE PICARD.
		A. FERNBACH.	RÉMY PERRIER.
		A. LEDUC.	

E. GOURSAT.....	Analyse supérieure et algèbre supér.
P. JANET.....	Electrotechnique générale.
F. WALLERANT.....	Minéralogie.
P. PAINLEVÉ.....	Mécanique anal. et mécanique céleste.
M. CAULLERY.....	Zoologie (Evolution des êtres organisés)
EMILE BOREL.....	Calcul des probabilités et phys. mathém.
H. ABRAHAM.....	Physique.
M. MOLLIARD.....	Physiologie végétale.
E. CARTAN.....	Géométrie supérieure.
GABRIEL BERTRAND.....	Chimie biologique.
JEAN PERRIN.....	Chimie physique.
L. LAPICQUE.....	Physiologie générale.
M ^{me} P. CURIE.....	Physique générale et radioactivité.
G. URBAIN.....	Chimie générale.
L. MARCHIS.....	Aviation.
E. VESSIOT.....	Théorie des fonct. et th. des transf.
A. COTTON.....	Physique générale.
J. DRACH.....	Application de l'analyse à la géométrie.
CHARLES FABRY.....	Physique.
R. LESPIEAU.....	Théories chimiques.
P. PORTIER.....	Physiologie comparée.
CHARLES PÉREZ.....	Zoologie.
E. BLAISE.....	Chimie organique.
P.-A. DANGEARD.....	Botanique.
LÉON BERTRAND.....	Géolog. structurale et géolog. appliquée.
E. RABAUD.....	Biologie expérimentale.
G. JULIA.....	Calcul différentiel et calcul intégral.
PAUL MONTEL.....	Mécanique rationnelle.
V. AUGER.....	Chimie appliquée.
P. WINTREBERT.....	Anatomie et histologie comparées.
O. DUBOSQ.....	Biologie maritime.
EUGÈNE BLOCH.....	Physique théorique et phys. céleste.
A. MAILHE.....	Etude des combustibles.
L. LUTAUD.....	Géogr. physique et géol. dynamique.
HENRI VILLAT.....	Mécanique des fluides et applications.
CH. JACOB.....	Géologie.
P. PASCAL.....	Chimie minérale.
LÉON BRILLOUIN.....	Théories physiques.
E. ESCLANGON.....	Astronomie.
H. BENARD.....	Mécanique expérimentale des fluides.
C. MAUGUIN.....	Minéralogie.
L. BLARINGHEM.....	Botanique.
A. GUILLIERMOND.....	Botanique (P. C. N.).
A. DENJOY.....	Math. générales.
A. DUFOUR.....	Physique (P. C. N.).
N.....	Mécanique physique et expérimentale.

Professeurs

A circular stamp with the text "R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN" arranged in a circle around the word "LEIDEN" at the bottom.



E. PÉCHARD.....	Chimie (Ens. P. C. N.)	M ^{me} RAMART-LUCAS	Chimie organique.
A. GUILLET.....	Physique.	BEGHIN.....	Méc. théor. des fluides.
M. GUICHARD.....	Chimie minérale.	FOCH.....	Méc. expér. des fluides.
A. MICHEL-LEVY.....	Pétrographie.	PAUTHENIER.....	Physique (P. C. N.).
A. DEREIMS.....	Géologie.	VILLEY.....	Mécanique physique et expérimentale.
H. MOUTON.....	Chimie physique.	De BROGLIE.....	Théories physiques.
L. DUNOYER.....	Optique appliquée.	LABROUSTE.....	Physique du Globe.
M. JAVILLIER.....	Chimie biologique.	FREUNDLER.....	Chimie (P. C. N.).
ROBERT-LEVY.....	Zoologie.	PRENANT.....	Zoologie.
A. DEBIERNE.....	Radioactivité.	P. JOB.....	Chimie générale.
E. DARMOIS.....	Physique.	CHRETIEN.....	Optique appliquée.
G. BRUHAT.....	Physique.	G. BOHN.....	Zoologie (P. C. N.).
F. PICARD.....	Zool. (Év. êtres org.).	R. COMBES.....	Botanique (P. C. N.).
L. JOLEAUD.....	Paléontologie.	BOURGUEL.....	Chimie (P. C. N.).
M. FRÉCHET.....	Calcul des probab. et phys. mathém.	GARNIER.....	Mécanique Rationnelle.

Secrétaire..... A. PACAUD

RECHERCHES BIOCHIMIQUES
SUR LA
NUTRITION DES PROTOZOAIRE.
LE POUVOIR DE SYNTHÈSE

PAR

André LWOFF
Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547119_0068

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION.	3

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE PREMIER. — POLYTOMA UVELLA.

Historique	9
Isolement d'une souche	13
Détermination spécifique.	15
Milieux d'entretien	17
Les sources azotées organiques.	20
Les sels d'ammonium. Le Fer	29
Les sources carbonées organiques	32
La structure des composés azotés favorables.	37

CHAPITRE II. — GLAUCOMA PIRIFORMIS.

Historique	42
Isolement et Purification.	42
Milieux d'entretien	45
Nutrition particulière et nutrition diffusive.	49
Influence des extraits d'organes sur la multiplication.	51
Eclectisme trophique et potentialités pathogènes	53
La nutrition des phagotrophes obligatoires	56
<i>Acanthamœba castellanii</i>	59
Remarques sur <i>Colpidium colpoda</i>	60
Travaux divers sur la culture des Ciliés	61
Etude des modifications chimiques des milieux peptonés pendant le développement d'une culture	62
Essai d'anaérobiose	70
Pouvoir de synthèse	71

CHAPITRE III. — CHLAMYDOMONAS AGLOËFORMIS ET HÆMATOCOCCUS PLUVIALIS.

Historique	74
Pouvoirs de synthèse à la lumière.	75
Pouvoir de synthèse à l'obscurité	76

A. LWOFF.

	Pages
Sources azotées utilisables	76
Sources carbonées organiques	79
Synthèse de la chlorophylle à l'obscurité	80
Remarque sur la synthèse de la carotène	81
CHAPITRE IV. — EUGLENA GRACILIS.	
Historique	82
Pouvoir de synthèse à la lumière	83
Pouvoir de synthèse à l'obscurité	84
Nutrition carbonée	90
La décoloration d' <i>Euglena gracilis</i>	92
<i>Euglena gracilis</i> et les autres Eugléniens.	93
DEUXIÈME PARTIE	
CHAPITRE PREMIER. — COMPARAISON DU POUVOIR DE SYNTHÈSE DES DIVERS ORGANISMES.	
Comparaison des Protistes Eucaryotes	95
Champignons. Bactéries	102
CHAPITRE II. — CLASSIFICATION PHYSIOLOGIQUE.	
Historique	106
Classification	109
CHAPITRE III. — CORRÉLATIONS MORPHOLOGIQUES ET PHYSIOLOGIQUES.	
Remarques sur la nutrition azotée des Eucaryotes	115
Remarques sur la nutrition carbonée	119
Définition physiologique des Chlorophytes, des Leucophytes et des Protozoaires	125
CHAPITRE IV. — L'ÉVOLUTION MORPHOLOGIQUE ET PHYSIOLOGIQUE DES PROTISTES EUCARYOTES.	
Arguments physiologiques	127
Faits morphologiques	129
Données dynamiques et expérimentales	131
Les facteurs de l'évolution morphologique	134
L'évolution physiologique	136
Remarques sur les ferments cellulaires	140
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS	145
BIBLIOGRAPHIE	149

INTRODUCTION

Nous divisons avec E. CHATTON (1926) les Protistes en :

1° *Protistes Procaryotes*, dépourvus de noyau défini et de mitochondries individualisées : Bactéries et formes affines.

2° *Protistes Eucaryotes*, pourvus d'un noyau et de mitochondries. Ce sont les Protozoaires dans la plus large acception du terme. Pour la commodité de l'exposé qui va suivre, nous divisons arbitrairement les Protistes eucaryotes, ou *Eucaryotes*, en deux groupes :

a) Les *Protozoaires* (s. s. qui comprennent les Eucaryotes dépourvus de chlorophylle.

b) Les *Chlorophytes* qui contiennent groupés les Eucaryotes possédant de la chlorophylle et un ou plusieurs plastes. Parmi les Chlorophytes, nous distinguerons les *Leucophytes* qui ont un plaste mais pas de pigment chlorophyllien. Ces divisions seront justifiées au cours du travail (v. p. 99).

Nous définissons le pouvoir de synthèse d'un organisme par la nature des composés azotés les plus simples qui sont indispensables à sa croissance et à sa multiplication.

*
* *

Il appartenait à PASTEUR (1858-1859-1860) de découvrir et de démontrer que des organismes sans chlorophylle peuvent faire la synthèse de leurs constituants à partir de sels d'ammonium comme unique source azotée, d'un acide organique, acide tartrique et de sucre, comme source carbonée, et de quelques sels, phosphates, cendres de levure.

Jusqu'à ces dernières années, il semblait que ce pouvoir très étendu de synthèse des constituants protidiques à partir des sels minéraux fût le privilège exclusif des Bactéries et des Champignons (moisissures, levures, etc...). On connaissait chez les Protistes Eucaryotes deux types de nutrition : l'autotrophie des Chlorophytes, c'est-à-dire la nutrition aux dépens de substances

minérales grâce à la fonction chlorophyllienne, et l'hétérotrophie des Protozoaires, définie simplement par le besoin de substances organiques. Or, on savait aussi que les Protozoaires dérivent de Chlorophytes et nous nous sommes demandé, étant donnée cette origine à partir d'organismes se nourrissant d'aliments minéraux, si les Protozoaires ne présenteraient pas eux-mêmes des types physiologiques variés.

Déterminer avec le plus de précision possible la nature de ces composés organiques nécessaires à quelques Protistes convenablement choisis, tel a été le but que nous nous sommes fixé en 1921, date à laquelle ce travail a été entrepris.

*
* *

C'est en 1890 que MIQUEL, puis BEIJERINCK réalisent la culture bactériologiquement pure de divers Chlorophytes. Leurs travaux ont été suivis de beaucoup d'autres et c'est par centaines que l'on peut compter les Chlorophytes isolés à l'état de pureté. Ces Chlorophytes sont autotrophes, c'est-à-dire qu'ils fixent le CO_2 grâce à la fonction chlorophyllienne et se nourrissent de composés minéraux. Nous n'insisterons pas sur ce sujet qui a fait l'objet d'un exposé très documenté de KUFFERATH (1929).

En 1893, OGATA réalise pour la première fois la culture bactériologiquement pure d'un Flagellé sans chlorophylle, *Polytoma uvella*. En 1898, TSUJITANI réussit à entretenir une souche d'Amibe en l'absence de bactéries vivantes. Ces essais sont repris par EHLER (1916 à 1924) qui isole en culture pure des Amibes, des Flagellés et des Ciliés. EHLER montre que tous ces organismes, qui, dans les conditions naturelles, se nourrissent de particules vivantes, bactéries, levures..., peuvent être entretenus indéfiniment en l'absence de tout élément vivant à condition qu'on leur fournisse une nourriture particulière appropriée. Les travaux de OGATA, TSUJITANI, EHLER, ne nous apportent et ne pouvaient nous apporter aucune précision d'ordre biochimique sur les besoins alimentaires des organismes étudiés. La seule conclusion que l'on est en droit de tirer de leurs travaux est que les Ciliés, les Amibes, certains Flagellés ont besoin de substances organiques complexes.

Il fallait trouver des organismes capables de se nourrir de substances liquides, condition nécessaire pour l'étude de la

valeur alimentaire des composés organiques chimiquement définis, la plupart des corps intéressants étant solubles dans les milieux aqueux. Il était d'autre part de toute nécessité de ne travailler qu'avec des cultures bactériologiquement pures.

Les Protozoaires vivent dans des milieux riches en bactéries. C'est aux dépens des bactéries qu'ils se nourrissent dans les célèbres infusions de foin ou de salade qui sont les milieux les plus couramment employés. Il est évidemment plus simple de négliger les bactéries, et beaucoup de protistologues ont abordé d'importants problèmes biologiques, déterminisme de la sexualité, hérédité, en travaillant avec des cultures impures. Ils raisonnent comme si, dans l'infusion du foin, les Ciliés se nourrissaient du milieu lui-même et non des bactéries qui s'y développent. Il est très remarquable de voir des auteurs parler de « conditions constantes », d'action des « facteurs internes », alors que les aliments qu'ils fournissent à leurs Protozoaires en expérience sont constitués par une flore bactérienne le plus souvent inconnue et variable.

Les recherches de E. et M. CHATTON ont montré que la conjugaison des Infusoires, dépend, entr'autres facteurs, du contenu bactérien des cultures, qu'il y a des bactéries zygotènes et azygotènes, et que les produits du métabolisme bactérien, par exemple l'acide pyruvique produit aux dépens du glucose, jouent dans certains cas un rôle primordial. Il est actuellement impossible d'aborder un problème quelconque relatif à la sexualité ou simplement à la multiplication des Protozoaires sans tenir compte du contenu bactérien des cultures.

Ce qui est vrai pour les recherches sur la sexualité l'est à plus forte raison pour les questions de nutrition. Cependant, nombre d'auteurs font abstraction des bactéries. C'est ainsi que DOFLEIN (1916) a établi un groupe de « Zuckerflagellaten » pour des Protozoaires semblant utiliser les glucides en cultures impures, sans se demander si les Protozoaires utilisent véritablement les glucides eux-mêmes, ou les glucides transformés par les bactéries, ou encore les bactéries elles-mêmes ayant pullulé à la faveur des glucides. La distinction à faire entre les travaux effectués avec des cultures pures ou impures est d'ailleurs très difficile à faire, les auteurs négligeant pour la plupart de préciser les conditions de leur travail. Les plus exigeants mêmes ont

de ces négligences. Par exemple, KUFFERATH qui attache une réelle importance à la pureté des cultures écrit dans son travail de 1929 : « Au lieu de peptone, on a employé des extraits de Liebig, du bouillon de culture, mais ces substances conviennent mieux aux Flagellates et aux protistes non chlorophylliens, voir WOODRUFF, JOLLOS 1921, LWOFF 1925 ».

Or, WOODRUFF et JOLLOS n'ont eu que des cultures impures, c'est-à-dire que leurs infusoires se nourrissaient, non du milieu, mais des bactéries s'y étant développées, tandis que le milieu peptoné que nous avons préconisé servait à la culture bactériologiquement pure de *Glaucoma piriformis* ainsi que nous avons soin de toujours le spécifier dans nos notes (1923, 1925, 1929). De même KUFFERATH donne (p. 76), à la suite l'un de l'autre et sans aucune indication, la formule du milieu de PRINGSHEIM pour la culture pure de *Polytoma uvella* et celle du milieu de PRINGSHEIM pour la culture impure d'*Astasia*. Comme on le voit, il est très difficile de faire la discrimination entre les travaux correctement effectués et les autres.

Beaucoup de protistologues ignorent donc totalement l'existence des bactéries. Quant aux physiologistes, on peut les classer en trois catégories : ceux qui ajoutent une foi aveugle aux travaux effectués par les protistologues, par exemple BAYLISS qui cite un seul mémoire sur la nutrition des Protozoaires, à savoir le travail de PETERS réalisé avec des cultures impures (voir p. 60); ceux qui ignorent complètement les travaux des protistologues, comme ARTHUS qui écrit dans son *Traité de physiologie microbienne* (1921) : *Nous n'avons pas réussi à cultiver les protozoaires in vitro* (en italique dans le texte) et ceux enfin, les plus nombreux, qui ne parlent pas du tout des protozoaires.

Nous tenons donc à préciser : 1° que nous n'avons tenu compte dans notre exposé que des travaux effectués avec des cultures bactériologiquement pures; 2° que toutes nos recherches personnelles ont été poursuivies avec des cultures bactériologiquement pures dont la pureté est fréquemment contrôlée par des examens et des épreuves rigoureux.

Nous appelons « culture pure » une culture qui ne renferme qu'une seule espèce d'organisme vivant.

Notre travail est divisé en deux parties. Dans la première, sont

étudiés les besoins azotés et carbonés de quelques organismes sans chlorophylle et d'organismes à chlorophylle cultivés à l'obscurité, c'est-à-dire chez lesquels l'assimilation chlorophyllienne a été supprimée. La constitution des aliments azotés les plus simples nécessaires à un organisme pour effectuer sa croissance et sa multiplication définit le pouvoir de synthèse. Sont étudiés successivement : *Polytoma uvella* (Flagellé Chlamydomonadiné), *Glaucoma piriformis* (Cilié holotriche), *Chlamydomonas agloëformis* et *Hermatococcus pluvialis* (Chlamydomonadinés), *Euglena gracilis* (Euglénien).

Dans la seconde partie, sont tout d'abord comparés les besoins alimentaires des divers Eucaryotes, puis ceux-ci sont envisagés comparativement aux Champignons et aux Bactéries. Nous établissons quelques relations entre les constituants cytoplasmiques et les caractères de la nutrition azotée et carbonée. Une classification physiologique est proposée. Enfin, après avoir exposé les résultats sur l'évolution morphologique des Chlorophytes et des Protozoaires, nous montrerons qu'il est possible d'envisager une évolution physiologique qui est, énergénétiquement, une dégradation.

*
* *

Nous n'avons pas jugé utile de donner dans un chapitre spécial un historique détaillé du pouvoir de synthèse des Protozoaires. Les travaux qui se rapportent à ce sujet — il y en a d'ailleurs très peu — seront analysés dans les chapitres spéciaux. Nous nous contenterons d'indiquer que, depuis l'époque à laquelle ce travail a été commencé, ont paru plusieurs travaux importants. Nous citerons en premier lieu celui de PRINGSHEIM paru en 1921. PRINGSHEIM y démontre que le leucophyte *Polytoma uvella* peut faire la synthèse de ses constituants à partir d'un sel d'ammonium comme seule source azotée, et qu'une source carbonée organique indépendante est indispensable. Ce travail n'a pas été sans exercer une influence importante sur le cours de nos recherches. En 1923, paraissait le mémoire de G. ZOTTA dans lequel il est mis en évidence qu'un Trypanosome, *Leptomonas pyrrhocoris*, ne se multiplie dans les milieux nutritifs que si l'on y ajoute une minime quantité de sang ; ZOTTA attribuait à une « catalase » le pouvoir activant du sang.

Depuis, M. LWOFF a étendu ces résultats, comparé la nutrition des Trypanosomides à celle de *Glaucoma piriiformis* et montré que la substance indispensable du sang est une substance à fonction peroxydasique. De 1928 à 1931, Hisatake DURI a publié une série de travaux sur la physiologie des Euglénien, en particulier sur le besoin de substances organiques simples ou complexes que montrent certaines espèces à chlorophylle.

*
* *

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Protistologie de l'Institut Pasteur où nous avons trouvé tous les moyens matériels pour le mener à bien. Nous sommes heureux de pouvoir exprimer ici notre reconnaissance à notre maître F. MESNIL, Professeur à l'Institut Pasteur, qui dirige ce laboratoire, ainsi qu'à ED. CHATTON, Directeur de l'Institut de Zoologie et de Biologie générale de l'Université de Strasbourg, qui nous a initié à la recherche scientifique et dont nous sommes devenu le collaborateur.

Nous remercions aussi M. M. SCHEN, Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur, que nous avons souvent consulté et qui nous a toujours donné d'excellents conseils.

Nous tenons enfin à exprimer notre respectueuse gratitude à M. le docteur ROUX qui s'est toujours intéressé à nos recherches et a accepté de publier ce mémoire dans la collection des « Monographies de l'Institut Pasteur ».

Paris, janvier 1932.

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE PREMIER

POLYTOMA UVELLA

(*Flagellé Chlamydomonadiné*).

Historique.

La première culture bactériologiquement pure de *Polytoma uvella* a été réalisée par OGATA en 1893 dans un milieu contenant du bouillon de viande, du glucose et une décoction de *Porphyra vulgaris* (Algue). Dans ce milieu, OGATA a pu entretenir une culture pendant cinq mois. Il a noté que *Polytoma* peut également se multiplier sur milieux solides en formant des petites colonies blanchâtres à la surface du milieu. « On peut donc, concluait OGATA, obtenir des cultures pures de Protozoaires ... et on est donc en état d'étudier leur physiologie ». Il semble bien que ce soit OGATA qui ait réalisé la première culture bactériologiquement pure d'un leucophyte à nutrition diffusive.

En 1910, H. C. JACOBSEN réussit à son tour à entretenir une culture pure de *Polytoma uvella* dans un milieu organique complexe constitué par une solution stérilisée de fibrine ayant subi l'action de diverses bactéries indéterminées.

En 1921, E. G. PRINGSHEIM, partant comme JACOBSEN d'une culture impure en milieu organique renfermant des substances protidiques en putréfaction (gélatine), est arrivé à isoler une culture pure de *Polytoma uvella* et, chose plus importante, à définir les substances aux dépens desquelles le flagellé se nourrit. PRINGSHEIM a d'abord essayé d'utiliser des substances

protidiques dégradées par des bactéries protéolytiques, puis des acides aminés divers, additionnés ou non de glucose. Le glycolle s'est montré, dans ces essais préliminaires, légèrement supérieur aux autres acides aminés. Cependant les cultures obtenues dans les milieux à base de glycolle étaient très pauvres et PRINGSHEIM en conclut qu'il devait manquer à son milieu un corps qui, formé aux dépens de la gélatine dans les cultures impures, conditionnait la croissance des flagellés. Une série de considérations cytologiques et biochimiques ont conduit PRINGSHEIM à la solution du problème.

Polytoma uvella forme de l'amidon qui est habituellement synthétisé aux dépens des glucides. Or, les acides aminés résultant du clivage simple des albumines ne se sont pas montrés des aliments enrichissants pour *Polytoma* et ne peuvent qu'à peine être utilisés pour la synthèse de l'amidon. Comme les acides aminés renferment de l'azote et non l'amidon, les acides aminés doivent être décomposés en deux parties, avec et sans azote, la fraction sans azote pouvant être utilisée pour la synthèse de l'amidon. Or, comme partie sans azote, on trouve, en premier lieu, les acides gras qui se forment pendant la putréfaction anaérobie des protides. C'est ainsi qu'à partir du glycolle (acide α -aminoacétique), très abondant dans la gélatine, on peut obtenir de l'acide acétique.

Par exemple, un acide aminé $R.CH_2.NH_2.COOH$ donnera, sous l'influence de bactéries en aérobiose, une amine $R.CH_2.NH_2$ et du CO_2 .

En anaérobiose on aura, soit la formation d'un acide $R.CH_2.COOH$ et d'ammoniaque NH_3 , soit formation d'un acide $H.COOH$ et d'une amine $R.CH_2.NH_2$.

La conclusion de cette suite de déductions devait se trouver bientôt vérifiée. PRINGSHEIM est amené à réaliser, après quelques tâtonnements, un milieu de culture ainsi constitué :

Acétate de sodium	2	
Glycolle.	2	
Glucose	2	
Carbonate de potassium	2	
Sulfate de Mg (cristallisé).	0,1	Milieu I de Pringsheim
Phosphate bipotassique.	0,2	
Eau.	1.000	

Ce milieu a permis l'obtention de très bonnes cultures de *Polytoma*. Si l'on supprime l'acétate de sodium, c'est-à-dire si l'on utilise uniquement le glucose comme source de carbone organique, on n'observe qu'une multiplication très faible. Le milieu ci-dessus peut être gélosé (ajouter 20 gr. d'agar pour 1.000 cm³ de milieu).

Poursuivant ses recherches, PRINGSHEIM montre qu'en présence d'acide acétique — sous forme d'un sel de sodium —, les sels d'ammonium peuvent servir de source azotée. Le milieu suivant :

Sulfate de Mg.	0,1	
Phosphate bipotassique	0,2	
Acétate d'ammonium	2	Milieu II de Pringsheim
Eau.	1.000	

fut alors constitué.

A 20-22°, optimum thermique, on remarque déjà, deux jours après l'ensemencement, une multiplication appréciable. Au 4^e jour, un bon développement. Au 11^e jour, les organismes forment sur la paroi du tube une couche épaisse de formes riches en graisse.

L'acétate d'ammonium peut être remplacé par du sulfate ou du phosphate d'ammonium (1 pour 1.000) ; on réalise ainsi un milieu dont la base organique comprendra de l'acétate de sodium et un sel d'ammonium. Les nitrates ne peuvent être utilisés comme source d'azote. L'addition au milieu II de Pringsheim (à l'acétate d'ammonium) de glucose ou de glycocolle n'améliore que très peu le développement des cultures.

PRINGSHEIM a fait varier la source azotée organique de son milieu n° 1. Remplaçant le glycocolle successivement par : alanine, leucine, acide aspartique, tyrosine, peptone, albumine d'œuf, il constate que tous ces composés permettent une bonne culture, mais que celle-ci n'a été nulle part aussi abondante que dans le milieu témoin au glycocolle, lequel, indépendamment de l'acétate d'ammonium, constitue la meilleure source azotée.

L'acide aspartique, au point de vue de sa valeur alimentaire, se rapproche le plus du glycocolle. L'albumine est « la plus mauvaise » des sources azotées et la peptone n'est « pas beaucoup meilleure ».

Dans son milieu I, à base de glycocolle-acétate de sodium, PRINGSHEIM a supprimé le glucose ou l'a remplacé par : saccharose, maltose, lactose, dextrine, amidon soluble. Les milieux sucrés ne sont pas acidifiés et ne sont pas supérieurs aux milieux sans glucides. On a l'impression, dit PRINGSHEIM, que le glucose n'exerce que rarement une action accélérante. Cette action s'observe cependant le plus souvent quand la solution alcaline de glucose a été caramélisée par la stérilisation. PRINGSHEIM montre également que le glucose est inutilisable comme seule source de carbone, en présence de sulfate ou de phosphate d'ammonium comme source azotée. Enfin PRINGSHEIM remplace l'acide acétique par un certain nombre d'acides organiques.

L'acide formique sous forme de formiate d'ammonium est tout à fait inutilisable ; l'acide propionique est meilleur ; l'acide butyrique peut être utilisé et permettre une culture « pas trop mauvaise ». Les acides oxalique, citrique, malique, tartrique, succinique sont inutilisables.

Les conclusions de PRINGSHEIM sont les suivantes :

1° L'acide acétique (sels) constitue la nourriture spécifique de *Polytoma uvella*. L'acide butyrique peut être utilisé également ;

2° une réaction alcaline du milieu est favorable ;

3° comme source d'azote, peuvent être utilisés les sels d'ammonium, le glycocolle et d'autres acides aminés. La peptone est mal utilisée, l'albumine encore plus mal. Les nitrates ne sont pas utilisables ;

4° le glucose n'est pas utilisable comme source de carbone.

Plus tard, dans leur beau travail sur le comportement chimiotactique de *Polytoma uvella* vis-à-vis de divers composés, PRINGSHEIM et MAINX (1926) ont repris l'étude d'un certain nombre de sources carbonées organiques. Avec le sulfate d'ammonium comme source d'azote, ils ont étudié la valeur, en tant qu'aliment carboné, de plusieurs acides donnés sous forme de leurs sels de sodium.

L'acide acétique est le plus favorable, puis vient l'acide butyrique. « Notablement plus mauvais » sont les acides propionique et valériannique. Ne permettent aucune culture, les acides : fumarique, heptylique, nonylique et palmitique.

L'addition des acides : acétique, propionique, butyrique, valériannique et caprylique à des cultures en inanition (culture de

Polytoma ayant séjourné 3 ou 4 jours dans de l'eau de robinet), ont permis la formation d'amidon. D'autres corps : acides mono- et trichloracétique (sels de Na), acides glycolique et lactique (sels de Na), acide gluconique (sels de Ca), acides acrylique, oléique, benzoïque, alcools éthylique et isobutylique, le glucose, se sont montrés inutilisables comme source carbonée.

PRINGSHEIM et MAINX font remarquer que les acides acycliques à nombre impair d'atomes de carbone sont « plus défavorables » que les acides acycliques à nombre pair d'atomes : (C_1), heptylique (C_7), inutilisables ; propionique (C_3) et valérianique (C_5), plus mauvais que acétique (C_2), butyrique (C_4) et caprylique (C_8). Nous reviendrons ultérieurement, pour la discuter, sur cette conclusion.

Le travail de PRINGSHEIM marque une date importante dans l'histoire de nos connaissances sur la physiologie de la nutrition des Protozoaires. On avait, avant lui, cultivé à l'état pur des Trypanosomides ou des Flagellés bactériophages ; mais, pour la première fois, PRINGSHEIM a réussi à déterminer de manière précise, à définir biochimiquement les besoins alimentaires d'un Flagellé à nutrition diffusive. Ses conclusions sont importantes parce qu'elles montrent qu'un leucophyte peut faire la synthèse de ses constituants à partir de corps très simples : sels d'ammonium (source azotée) et sels de l'acide acétique (source carbonée). La notion d'aliment carboné autonome indispensable est également une notion nouvelle très importante apportée par PRINGSHEIM et c'est grâce à cette notion que LWOFF et DUSI ont pu réaliser la culture indéfinie à l'obscurité d'*Euglena gracilis*.

Isolement d'une souche.

Au moment où paraissait le travail de PRINGSHEIM, nous commençons nos recherches sur la nutrition des Ciliés qui seront exposées dans un des chapitres suivants. Nous constatons que *Glaucoma piriformis* ne peut se multiplier que dans les milieux à base de « peptones », polypeptides complexes, et toutes les tentatives de simplification du milieu ne nous donnaient que des résultats négatifs. Frappé par les différences physiologiques qui

séparent *Glaucoma* et *Polytoma* et intéressé par les conclusions de PRINGSHEIM, nous avons résolu de vérifier celles-ci.

Origine de la souche. — Une infusion de paille provenant des écuries de l'Institut Pasteur nous fournit une culture sauvage abondante de *Polytoma uvella*.

Isolement. — Des tubes de gélose de MUSGRAVE et CLEGG (gélose à l'extrait de viande de Liebig), additionnés d'eau de robinet stérile, sont ensemencés avec l'infusion de paille. C'est à partir d'un seul Flagellé isolé d'un de ces tubes qu'a été obtenue la culture pure.

Des boîtes de Petri contenant chacune une lame soigneusement nettoyée sont stérilisées au four Pasteur pendant une heure à 180°. On se sert d'une quinzaine de ces boîtes. Dans chaque boîte, sur chaque lame, on dépose une goutte d'eau de robinet stérilisée par chauffage 20 minutes à 120° à l'autoclave.

A l'aide d'une pipette capillaire, on prélève quelques *Polytoma* dans la culture impure (tubes de gélose Musgrave-Clegg + eau de robinet) et on les dépose dans une des gouttes d'eau préparées en boîte de Petri. Sous la loupe binoculaire, on prélève alors, avec une pipette capillaire stérile, un seul flagellé que l'on transporte dans une autre goutte. Les cinq premiers lavages sont faits très rapidement pour éliminer le gros des bactéries. Les dix autres sont faits plus lentement ; on laisse le flagellé séjourner 2 ou 3 minutes dans chaque goutte, afin qu'il puisse se débarrasser des bactéries qui, par hasard, peuvent être accolées à sa membrane. Après le 15^e lavage, le *Polytoma* est enfin transporté dans un tube de gélose de Musgrave-Clegg additionnée d'eau peptonée. 8 jours après, une culture abondante de *Polytoma* s'est développée dans le liquide.

Cette culture est alors ensemencée dans le milieu de PRINGSHEIM à l'acétate de sodium-glycocolle où elle est devenue très abondante.

Nous ne pouvons malheureusement donner ici le pourcentage de réussites qu'on peut obtenir par la technique indiquée puisque nous avons eu la chance extraordinaire d'obtenir au premier essai une culture bactériologiquement pure. Mais notre propre exemple nous permet de croire qu'en travaillant correctement, en opérant rapidement à l'abri des poussières, en laissant les boîtes de Petri le moins longtemps possible ouvertes, on doit, après

15 lavages, obtenir presque à coup sûr un flagellé pur, sans bactéries.

Nous conseillons cependant d'utiliser comme premier milieu pour la culture impure, à la place de la gélose Musgrave-Clegg que nous avons nous-même employée, le milieu de Pringsheim à l'acétate de sodium-glycocolle, et comme milieu pour le flagellé après le dernier lavage, c'est-à-dire pour le flagellé considéré comme débarrassé de toute souillure bactérienne, le milieu peptoné à l'acétate de sodium dont nous donnerons la formule plus loin. En outre, ils nous paraît préférable, lorsqu'on ensemence un seul individu, de l'ensemencer dans une petite quantité de liquide : 1 à 2 cm³ dans un tube à essais d'un diamètre de 10 à 12 mm. environ.

Epreuves de pureté bactériologique. — Nous avons naturellement pratiqué immédiatement des épreuves de pureté.

1 cm³ d'une culture riche en milieu de Pringsheim a été porté dans les milieux suivants :

- 1° bouillon peptoné ;
- 2° bouillon peptoné + sang frais de lapin (1 pour 20) ;
- 3° gélose-bouillon ;
- 4° gélose de Musgrave-Clegg ;
- 5° gélose au sang N. N. N. ;
- 6° gélose de Sabouraud ;
- 7° gélose de Veillon en culot (anaérobiose).

Pour chacun de ces milieux, deux tubes ont été ensemencés ; l'un est laissé à la température du laboratoire, l'autre porté à l'étuve à 37°.

L'examen direct des cultures, telles quelles ou centrifugées, et l'examen de tous les milieux d'épreuve n'ayant montré la présence d'aucune bactérie ni d'aucun champignon, nous avons conclu à la pureté bactériologique de la souche.

Détermination spécifique.

Voici d'après VOLKONSKY (1930) les caractères distinctifs de notre souche.

« Corps ovoïde ou elliptique, postérieurement arrondi, mesurant de 14 à 21 μ de long sur 5 à 12 μ de large ; les flagelles ont

une fois et demie la longueur du corps ; la papille cytoplasmique, à nu chez les individus jeunes, est recouverte chez les adultes par une papille membraneuse ; une, ou souvent deux vacuoles pulsatiles ; pas de stigma ; dans certains cas cependant un amas

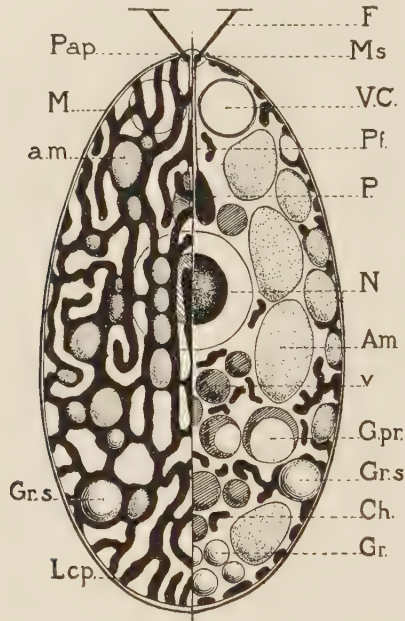


FIG. 1. — *Polytoma uvella*.

Figure synthétique, montrant les constituants cytoplasmiques et les enclaves cellulaires. Moitié gauche, vue superficielle ; moitié droite, plan médian (d'après VOLKONSKY, 1930, a).

F, flagelle ; *Pap*, papille protoplasmique ; *Ms*, mastigosome ; *M*, membrane ; *VC*, vacuole contractile ; *Pf*, « Parabasaltaden » ; *am*, jeune grain d'amidon dans une maille du leucoplaste ; *P*, corps parabasal ; *N*, noyau ; *Am*, grain d'amidon libre ; *v*, vacuole à métachromatine ; *Gpr*, grain protéique ; *Grs*, « graisse de sénescence » ; *Ch*, chondriome ; *Gr*, graisse normale ; *Lcp*, réseau leucoplastique.

ou une traînée de globules gras chargés de carotène là où le stigma serait à rechercher ; mais cet amas n'est localisé sur aucun organe particulier. Nous avons donc à faire à une race dépourvue de stigma, de la sous-espèce *uvella*, *sensu stricto* de PASCHER ».

Milieux d'entretien.

Dès nos premiers essais de culture, ayant constaté la légère supériorité de l'asparagine sur le glycocolle, nous remplacions le glycocolle du milieu de culture par l'asparagine. D'autre part, PRINGSHEIM ayant montré que les glucides n'ont que rarement une action favorisante — et encore est-elle très faible — sur le développement des cultures, nous avons totalement supprimé les sucres des milieux d'entretien. D'ailleurs l'introduction des glucides dans les milieux exige des précautions spéciales. La stérilisation à 120° pendant 15 à 20 minutes devient impraticable par suite de l'acidification qu'elle entraîne. Il faut, ou bien ajouter des solutions stériles de glucides après stérilisation du milieu, ou bien tyndalliser les milieux sucrés. Dans le cas de *Polytoma*, ces complications sont parfaitement évitables, puisque la suppression des glucides n'entraîne aucune perturbation dans l'entretien de la souche.

Par ailleurs, au lieu d'ajouter au milieu une quantité donnée de carbonate de potassium, 2 à 5 pour 1.000 comme le propose PRINGSHEIM, nous ajoutons, goutte à goutte, une solution concentrée de carbonate de potassium dans l'eau distillée jusqu'à ce que le milieu présente un pH voisin de 8,00. Les *Polytoma* se multiplient très bien à $\text{pH} = 7,2$ et le milieu au bout de quelques jours de culture est automatiquement amené à un pH voisin de 8,3-8,4. Il faut toutefois mieux ensemercer les flagellés dans un milieu de $\text{pH} = 8,0 \pm 0,2$.

Notre milieu est donc constitué de la manière suivante :

Sulfate de magnésium	0,25
Chlorure de potassium	0,25
Biphosphate de potassium	0,25
Acétate de sodium	2
Asparagine	2
Eau bidistillée	1.000

Solution de carbonate de potassium : q. s. pour amener le milieu à pH 8,00 (1) après stérilisation.

(1) Après stérilisation, le pH des milieux ajustés avec le carbonate de potassium monte de 0,5 à 0,7. Il faut donc ajuster le milieu vers 7,3 environ pour obtenir après chauffage un milieu de $\text{pH} = 8,0$. Cette précaution est inutile si l'on ajuste le pH avec de la soude.

Nous nous servons toujours d'eau redistillée dans un appareil en verre pyrex.

Le milieu est réparti en tubes à essais (8 à 10 cm³ de liquide par tube) et stérilisé à l'autoclave 15 ou 20 minutes à 115 ou 120°. Toute la verrerie que nous employons est en verre pyrex.

Ensemencement. — Notre souche pure de *Polytoma uella*, isolée le 3 mars 1926, a toujours été entretenue en milieux liquides. Cette condition nécessite des précautions techniques à respecter étroitement lors des passages afin d'éviter les contaminations toujours possibles des cultures.

1° Les cultures en milieu liquide étant conservées pendant 1 à 2 mois non capuchonnées, il est indispensable que le tampon de coton cardé qui constitue la seule fermeture du tube soit long et serré.

2° Les repiquages doivent être effectués dans des pièces fermées à l'abri de tout courant d'air.

3° Avant chaque expérience, le haut de chaque tube (culture ou milieu vierge à ensemenecer) est flambé jusqu'à roussissement très léger du coton préalablement rentré au ras du verre. Le bouchon de coton est alors tiré à mi-hauteur avec une pince flambée (on attend pour ouvrir le tube que le verre soit bien refroidi).

4° Après chaque ensemencement, on rentre le coton et le haut du tube est de nouveau flambé. Ce mode opératoire 1° assure la stérilisation du haut du tube et du coton et permet des manipulations aseptiques ; 2° il évite de flamber le coton en dehors du tube, manipulation qui entraîne à chaque repiquage l'essai-mage de nombreux fragments de coton carbonisé, sales et gênants, et qui a pour résultat de diminuer la longueur du bouchon.

5° Tous les ensemencements sont faits à la pipette Pasteur : tube de verre cylindrique de 5 à 8 mm. de diamètre externe, de 25 cm. de longueur, stérilisé après bouchage au coton aux deux extrémités au four Pasteur 1 heure à 180°. Le coton doit être légèrement roussi (couleur café au lait). La pipette est faite par étirement du tube stérilisé à la soufflerie (voir le *Traité de microscopie* de LANGERON pour figures et détails). Au moment de l'utiliser, on entaille la pipette à son extrémité d'un léger trait de lime, on flambe soigneusement la partie étirée, on laisse

refroidir, puis on l'ouvre à la hauteur du trait de lime à l'aide d'une pince flambée. Il est important que la pipette soit froide au moment où l'on aspire les flagellés.

6° Pendant que le tube demeure ouvert, il est indispensable de le maintenir dans une position la plus voisine possible de l'horizontale.

Nous nous excusons auprès des bactériologistes de donner ici des détails d'opérations aussi élémentaires et des explications qui leur paraîtront oiseuses. Mais nous avons constaté bien souvent que nombre de protistologues sont peu familiarisés avec les techniques bactériologiques. Nous avons cru également devoir indiquer notre technique car certains se sont étonnés que nous puissions entretenir des souches pures dans des milieux liquides. Nous estimons qu'aucune des précautions ci-dessus n'est superflue et que, de plus, ces précautions ne sont efficaces que si les manipulations sont exécutées avec le maximum de rapidité compatible avec la précision demandée (nécessité d'introduire la pipette dans le tube sans toucher à ses parois, par exemple).

Enfin, à chaque repiquage ou à chaque expérience, nous faisons une ou deux épreuves de pureté bactériologiques. Après ensemencement des milieux d'expériences, nous ensemençons en général : un tube de bouillon peptoné, un tube de gélose peptonée, un tube de gélose de Sabouraud. Cette précaution élémentaire permet de reconnaître très rapidement la présence de bactéries dans le tube-souche, bactéries qui peuvent facilement passer inaperçues, surtout dans des milieux du type de celui que nous utilisons (asparagine-acétate de Na) où les *Polytoma* se développent abondamment et où les bactéries peuvent être rares.

Notre technique nous paraît suffisamment rigoureuse puisque nous entretenons notre souche depuis bientôt 6 ans (le *Glaucoma piriformis* depuis 9 ans). Tous les ans, nous pratiquons des épreuves supplémentaires de pureté, ensemencements en milieux au sang et épreuves en anaérobiose en particulier.

Ensemencement proprement dit. — Pour réaliser les expériences, nous opérons de la manière suivante. Les milieux renfermant les corps à étudier sont répartis en tubes en contenant une dizaine de centimètres cubes. Le premier ensemencement est fait à partir du milieu d'entretien (voir plus haut) à la pipette

avec une goutte de culture. Il n'est jamais tenu compte des résultats du premier repiquage, non plus que de ceux du deuxième. Ce sont seulement les résultats du troisième repiquage que nous commençons à enregistrer comme valables, les résultats des deux premiers ensemencements pouvant être faussés par l'apport de substances étrangères au milieu à étudier, aussi bien de substances dissoutes dans le milieu lui-même que des réserves figurées abondantes que les flagellés renferment. L'étude du comportement de *Polytoma uvella* dans le milieu à base d'acétate d'ammonium montrera que ces précautions sont fort utiles. Ce mode opératoire a d'ailleurs été utilisé également par quelques bactériologistes étudiant le pouvoir de synthèse de certaines bactéries. C'est ainsi que BRAUN et CAHN-BRONNER dont nous aurons ultérieurement l'occasion de citer le travail, ont constaté que bien souvent le premier ensemencement dans un milieu est positif, parfois même le deuxième, puis les repiquages ultérieurs impossibles.

ERNST G. PRINGSHEIM n'a pas cru devoir indiquer la manière dont il ensemait ses milieux, ni le nombre des repiquages qu'il effectuait dans un milieu déterminé. Nous sommes convaincu qu'un certain nombre de ses conclusions — les moins importantes d'ailleurs — ont été malencontreusement faussées parce que cet auteur n'a pas observé les précautions dont nous avons parlé.

Les sources azotées organiques.

I. — *Les acides aminés.* — Nous nous proposons tout d'abord de vérifier les conclusions fondamentales de PRINGSHEIM : *Polytoma uvella* peut effectuer la synthèse de ses constituants à partir de corps très simples : source azotée : glycolle, source carbonée : acide acétique.

Ce résultat s'est trouvé vérifié d'emblée par nos premières cultures positives dans le milieu de Pringsheim au glycolle-acétate de soude (voir p. 10). PRINGSHEIM n'ayant étudié qu'un petit nombre d'acides aminés, nous avons tenté de déterminer les acides aminés utilisables par *Polytoma*. Dans le milieu dont nous avons donné la formule page 17, nous avons

donc remplacé l'asparagine par les composés suivants : cystéine (ou cystine), glycocolle, glucosamine, phénylalanine, tryptophane, tyrosine, histidine, acide glutaminique, sérine, proline, acide aspartique, leucine, lysine, arginine, histamine, créatine, sarcosine, glycyamine, alanine, guanidine, acétamide, urée.

Tous ont été employés à une concentration de 2 pour 1.000 sauf ceux qui n'étaient pas solubles à cette concentration et ont été étudiés en solution saturée.

Ils peuvent être classés en trois catégories : a) ceux qui permettent une culture rapide, très abondante, de *Polytoma uvela* ; b) ceux qui ne permettent qu'une culture lente et pauvre ; c) ceux qui n'en permettent pas du tout. Nous ne retiendrons que ceux de la première.

a) Dans cette première série, entrent : la cystéine, la glucosamine, l'asparagine, le glycocolle (la question des « peptones » et des sels d'ammonium est traitée séparément). Nous avons dans les premiers essais utilisé la cystine que nous faisons dissoudre à chaud dans un excès de soude. Ce milieu permettait de bonnes cultures mais nous l'avons abandonné à cause de la complication de son mode de préparation. Plus tard, nous nous sommes servi uniquement du chlorhydrate de cystéine. Les milieux à la cystéine, à l'asparagine ou au glycocolle ont été stérilisés à l'autoclave. Celui à la glucosamine a été tyndallisé : 3 chauffages de 1 heure à 70° à 24 heures d'intervalle, avec séjour à l'étuve à 37° pendant les intervalles des chauffages.

Le développement d'une culture dans un milieu donné varie suivant un certain nombre de conditions. Etudions d'abord comme exemple le développement d'une culture en milieu à l'asparagine-acétate de sodium. Soit un tube à essais de 15 mm. de diamètre contenant 10 cm³ de milieu. Nous l'ensemencions avec 1 goutte (très approximativement 1/20^e de cm³) d'une culture riche dans le même milieu. L'examen du tube *in toto* au faible grossissement du microscope permet de voir très facilement les flagellés. Dans les deux ou trois premiers jours qui suivent l'ensemencement, on ne peut voir que très difficilement des *Polytoma*. Ils ne deviennent abondants que vers le 4^e jour. Le milieu contient à ce moment environ 20 flagellés par millimètre cube. Ces flagellés se multiplient rapidement : au 7^e jour, on peut en compter par exemple 500 par millimètre cube, et 1.400

au 9^e jour. A partir du 9^e jour, la culture commence à décliner : au 17^e jour, 300 par millimètre cube, au 21^e, 80, au 24^e une vingtaine. Au bout d'un mois, il y a de rares *Polytoma* vivantes, 1 à 10 par millimètre cube, et après deux mois, on en trouve encore quelques-unes.

En général, avec un milieu à l'asparagine-acétate de sodium, en tube à essais de 15 mm. contenant 10 cm³ de milieu, le maximum de développement est atteint du 9^e au 12^e jour, selon naturellement le nombre de *Polytoma* présentes dans la goutte ensemencée. A partir du 9^e jour, un certain nombre de flagellés meurent et les cadavres tombent au fond du tube où ils forment un dépôt orangé (présence de carotène, PRINGSHEIM et MAINX, 1926). Mais d'autres flagellés continuent à se multiplier, de plus en plus lentement à mesure que la culture vieillit. Plus l'ensemencement initial est large, plus le développement est rapide et moins longtemps dure la culture. On a intérêt, pour l'entretien des souches, à procéder à des ensemencements le plus faibles possible.

Les densités que nous avons données correspondent aux chiffres de flagellés par millimètre cube de milieu, la numération étant faite après homogénéisation de la culture.

Les *Polytoma* s'assemblent à la partie supérieure de la colonne liquide immédiatement au-dessous de sa surface libre, fait déjà bien vu par PRINGSHEIM. Les flagellés se collent souvent au verre par leur flagelle, formant une anneau blanc épais pouvant atteindre 5 à 6 mm. de large. Parfois enfin, les *Polytoma* forment un voile à la surface du milieu, ressemblant au voile que forme le *Bacillus subtilis*. Ce voile est formé de flagellés confluents et réalise la densité maximum de la culture.

Si au lieu d'ensemencer un tube, nous ensemençons une fiole d'Erlenmeyer où le rapport surface-volume est beaucoup plus grand, toute la surface libre sera couverte d'un voile et le développement sera plus abondant.

L'étude du rendement énergétique avec différents corps et dans différentes conditions sera extrêmement instructive. Nous la réservons pour un travail ultérieur.

Avec la cystéine et la glucosamine, on obtient des cultures plus riches (1.700 flagellés par millimètre cube par exemple) et plus rapides que dans les milieux à l'asparagine. Dans le milieu à

base de glyocolle, le développement est plus lent que dans le milieu à l'asparagine. Mais, avec ces quatre composés, on a toujours des cultures riches renfermant plus de 1.000 flagellés par millimètre cube.

Le chlorhydrate de cystéine donne les meilleurs résultats; viennent ensuite la glucosamine, avec des résultats à peu près équivalents, l'asparagine et le glyocolle.

Dans toutes ces expériences, ainsi que nous l'avons exposé, la source carbonée était la même et fournie par l'acétate de sodium.

b) Les quatre corps étudiés : cystéine, glucosamine, asparagine, glyocolle, constituent un aliment azoté excellent. Nombre de corps azotés peuvent les remplacer; ce sont : la phénylalanine, le tryptophane, l'histidine, l'acide glutaminique, la sérine, la proline, l'acide aspartique, la leucine, la lysine, l'arginine, l'histamine, la créatine, la sarcosine, la glycoxyamine, l'alanine et la guanine. Tous, servant de source azotée, ont permis l'entretien durant trois repiquages successifs d'une culture de *Polytoma uvella*. Toutefois, le développement est peu abondant. Au premier repiquage et même au deuxième, on observe des cultures assez riches, mais au troisième, elles dépassent rarement une densité de 250 *Polytoma* par millimètre cube.

c) Enfin n'ont permis aucun développement de *Polytoma* (avec l'acide acétique comme source carbonée) : l'urée, l'indol, l'acétamide et les nitrates (de potassium ou de sodium).

II. — *Les sels d'ammonium*. — Nous mettons tout à fait à part les sels d'ammonium qui sont une excellente source azotée; l'étude de leur action est réservée pour un chapitre spécial.

III. — *Composés organiques complexes*. — Nous avons vu que PRINGSHEIM n'a obtenu avec les « peptones » que des cultures pauvres; cet auteur n'a pas indiqué quelles peptones il a utilisées.

Avec l'acétate de sodium comme source carbonée organique, nous avons étudié un certain nombre de composés complexes provenant de la digestion plus ou moins poussée de divers protides.

1° L'éreptone, muscle ayant subi successivement une digestion peptique puis tryptique et éreptique; ne renferme à peu près

que des acides aminés libres; elle est abiurétique et ne permet pas la culture de *Glaucoma piriformis* (voir p. 72).

2° Peptone de soie (Roche) obtenue par hydrolyse alcaline de la sérine de la soie; peptone incomplète; ne permet pas la culture de *Glaucoma piriformis*; permet la culture d'*Euglena gracilis* en présence d'acétate de sodium, pendant les premiers mois de sa vie à l'obscurité.

3° Muscle de bœuf ayant subi une digestion pancréatique très poussée; permet la culture de *Glaucoma piriformis* et de *Strigomonas (Leptomonas) oncopelti*.

4° Muscle de bœuf ayant subi une digestion pancréatique peu poussée; permet de très bonnes cultures de *G. piriformis* et de *Strigomonas oncopelti*.

5° Muscle de bœuf ayant subi une digestion pepsique peu poussée; permet de très bonnes cultures de *G. piriformis* et *Strigomonas oncopelti*, et, au début de sa vie à l'obscurité, la culture, sans addition d'acétate de sodium, d'*Euglena gracilis*,

6° Arachide digérée par la pepsine; permet de très bonnes cultures de *G. piriformis* et de *Str. oncopelti*.

Toutes ces peptones, à partir de 3° inclusivement, assurent, lorsqu'elles sont additionnées de sang, la nutrition azotée des Trypanosomides (*Leptomonas ctenocephali*, *Strigomonas fasciculata*).

7° Autolysat de levure de boulangerie (48 heures à 55°); permet de très bonnes cultures de *G. piriformis*; peut servir également de source azotée à divers Trypanosomides.

Toutes ces « peptones » ont permis d'obtenir de très bonnes cultures indéfiniment repiquables de *Polytoma uvella*.

Les protides très hydrolysés, riches en acides aminés, comme l'« éreptone » et la « soie hydrolysée », ont permis les meilleures cultures (formation très rapide d'un voile très dense de flagellés à la surface du milieu). Toutes les autres peptones, riches en polypeptides, qui permettent la culture du Cilié *Glaucoma piriformis* et des Trypanosomides (voir les pages 45 et 73), ont également donné des cultures riches de *Polytoma*: plus de 1.000 flagellés par millimètre cube. Dans une note antérieure (1929), nous avons indiqué que la peptone pepsique de viande ne fournit que des cultures lentes et pauvres. En réalité elle permet des cultures aussi abondantes que la peptone pan-

créatique. Mais quel que soit le degré d'hydrolyse de la substance protéique envisagée, une source carbonée organique est indispensable. On n'obtient aucune culture dans le milieu minéral (SO_4Mg , $\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$, KCl , CO_3K_2) peptoné à 2 pour 1.000.

POLYTOMA UVELLA

Nutrition azotée.

	Source carbonée : acide acétique ou acide butyrique
Nitrates	o
Sels d'ammonium	++
Asparagine	++
Glycocolle	++
Cystéine	++
Glucosamine.	++
Autres acides aminés	+
Peptones	++

Avec les peptones comme avec la cystéine, la glucosamine, l'asparagine et le glycocolle, *une source carbonée organique indépendante est indispensable.*

Indiquons ici en outre que ni l'ovalbumine ni le sérum (nous avons essayé uniquement le sérum de Lapin), introduits dans le milieu à l'acétate de sodium, n'ont permis la culture de *Polytoma*. ŒHLER (1924) a cependant obtenu de petites colonies de *Polytoma* sur sérum coagulé.

Un certain degré d'hydrolyse des substances protidiques semble donc indispensable à leur utilisation par *Polytoma uvela*. Les polypeptides plus ou moins complexes qui constituent les peptones pepsiques ou pancréatiques de muscle ayant subi un début de digestion sont-ils absorbés tels quels ou subissent-ils préalablement l'action d'une diastase qui les clive en peptides plus simples puis en acides aminés ? Remarquons tout d'abord que dans un milieu peptoné quelconque — nous ne parlons pas naturellement des milieux à base d'éreptone ou de peptone de soie — ajusté à un pH convenable, 8,0, la multiplication commence dès l'ensemencement, premier argument qui permet de

penser à l'utilisation directe des polypeptides. Cependant dans un milieu peptoné gélatiné :

Sulfate de magnésium	0,25
Chlorure de potassium	0,25
Biphosphate de potassium	0,25
Acétate de sodium	2
Peptone pepsique de viande de bœuf	2
Gélatine	150
Eau distillée	1.000
Carbonate de potassium : q. s. pour pH = 8.0	

les petites colonies de *Polytoma* qui se forment à la surface de la gélatine, d'abord *sur* la surface, ne tardent pas, dès le 4^e jour après l'ensemencement, à s'enfoncer dans la profondeur du milieu. Les régions de la gélatine qui présentent de nombreuses colonies montrent une surface bosselée et irrégulière, alors que les régions vierges sont lisses comme les milieux témoins (tubes maintenus dans ces expériences à 20°).

Au bout de plusieurs semaines néanmoins, la gélatine est liquéfiée en partie. Les *Polytoma* excrètent donc une gélatinase. Nous n'avons pas étudié le travail chimique de cette gélatinase. Il est peu probable qu'elle liquéfie simplement la gélatine sans produire d'hydrolyse des polypeptides. Mais le fait important pour nous ici est de constater la possibilité de diffusion d'une diastase, diffusion que nous retrouverons chez *Glaucoma piri-formis*.

Enfin, les recherches de VOLKONSKY (1930) nous fournissent un argument important en faveur de l'utilisation directe des polypeptides par *Polytoma*.

VOLKONSKY, étudiant notre souche de *Polytoma* au point de vue cytologique, a découvert un leucoplaste très développé, ramifié comme celui des Chlamydomonadines à chlorophylle. Or ce plaste montre, suivant la nature de l'aliment azoté fourni au flagellé, des variations importantes du développement global (quantitatif). Le plaste est développé au maximum dans un milieu à l'acétate d'ammonium, un peu moins développé avec un acide aminé, cystéine, glucosamine, glycolle ou asparagine; moins développé avec un mélange d'acides aminés; enfin, avec les peptones, on observe une réduction encore plus marquée. Le

plaste est encore assez développé avec l'éreptone, mélange d'acides aminés libres. Mais avec les peptones, pancréatiques ou pepsiques résultant de la digestion peu poussée du muscle de bœuf ou de panse de cheval, il est réduit au minimum.

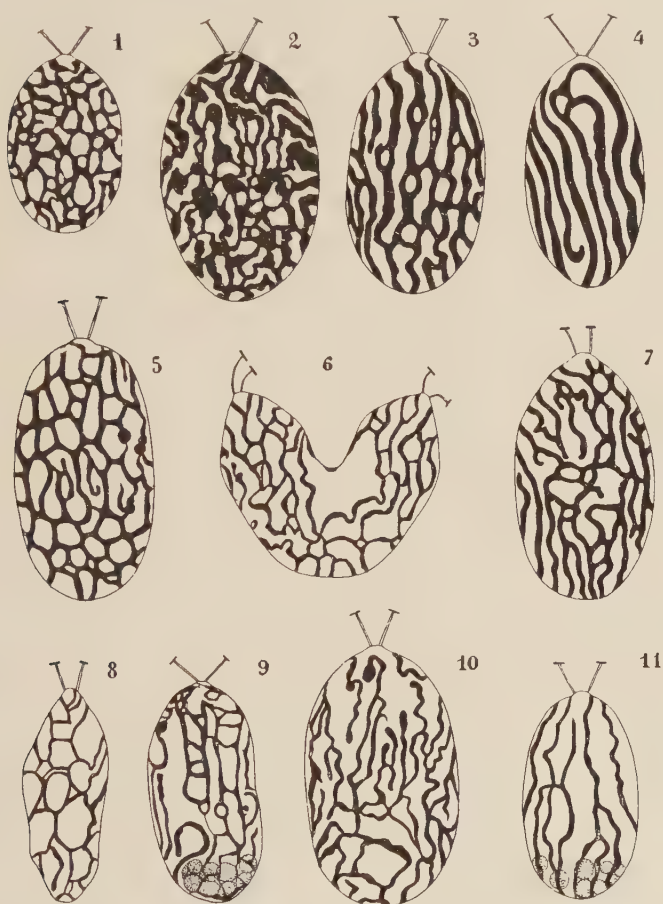


FIG. 2. — *Polytoma uvella*
(d'après VOLKONSKY 1930, E).

Leucoplastes typiques dans différents milieux de culture. 1 et 2 en acétate d'ammonium ; 3. en cystine + acétate de Na ; 4. en cystine + glucosamine + acétate de Na (forme striée) ; 5, en asparagine + acétate de Na ; 7, en « éreptone » ; 6. 8, 9, 10, en « peptone pancréatique peu poussée » (6, division) ; 11, en « peptone pepsique de panse de Cheval ».

Fixateur de Benoît (B. O. S. U.), rubine-S, vert-lumière.

Par une série de réactions histochimiques, VOLKONSKY a démontré que le plaste représentait un lieu d'élection pour divers éléments azotés. Et il conclut de ses recherches que la réduction progressive du plaste dans les peptones est parfaitement explicable si l'on admet que le plaste fixe les substances azotées. « La fixation d'une molécule d'un pentapeptide fournit en effet la même quantité d'azote que celle de cinq molécules d'un acide monoaminé. Il suffirait de supposer que les différents corps azotés se déplacent mutuellement au niveau du plaste en quantités équimoléculaires pour concevoir qu'il faut, pour fixer la même quantité d'azote, un appareil récepteur cinq fois plus considérable dans le cas d'un acide aminé libre que dans le cas d'un pentapeptide. De même en asparagine (contenant deux atomes d'azote par molécule), le plaste est-il moins développé que dans les autres acides aminés » (VOLKONSKY, 1930, p. 680).

Nous serons amené dans un chapitre de la partie générale à discuter le rôle du plaste dans les synthèses. Remarquons simplement ici, par anticipation, que la diminution de taille du plaste dans les milieux à base de polypeptides peut fort bien s'expliquer si l'on admet que les synthèses des substances protéiques sont réalisées dans le plaste. Si l'aliment azoté renferme tous les acides aminés constitutifs des protides (comme c'est le cas pour les peptones de muscles), le travail de synthèse sera très réduit, d'autant plus réduit qu'un certain nombre d'acides aminés sont groupés en peptides plus ou moins complexes.

Quoi qu'il en soit, nous pouvons tirer de ces expériences les conclusions suivantes : il est très probable que, dans une culture de *Polytoma uvella* en milieu peptoné, il se produit une hydrolyse « extra-cellulaire » des polypeptides, mais l'étude du développement des cultures et l'étude cytologique et histochimique de *Polytoma* permettent de conclure que certains polypeptides sont absorbés et utilisés par le flagellé, le leucoplaste jouant un rôle important dans la fixation et probablement le métabolisme des corps azotés.

Les sels d'ammonium. Le fer.

PRINGSHEIM a montré que les sels d'ammonium peuvent être utilisés par *Polytoma uvella* comme source azotée. Pour lui, les sels d'ammonium donnent d'aussi bons résultats que les acides aminés. Le milieu utilisé par PRINGSHEIM avait la composition suivante :

Acétate d'ammonium	2
Sulfate de magnésium	0,01
Phosphate acide de potassium	0,2
Carbonate de potassium	dose non indiquée
Eau distillée	1.000

Une première série d'essais avec le glycérophosphate d'ammonium et le sulfate d'ammonium remplaçant l'asparagine dans le milieu n° 1 nous avait donné des résultats favorables. Cependant le deuxième repiquage de la culture en milieu au sulfate d'ammonium n'avait été positif qu'après ensemencement de X gouttes. La troisième culture dans le milieu au glycérophosphate d'ammonium était partie très lentement quoique repiquée avec V gouttes.

Nous avons donc repris l'étude de l'ammonium comme source azotée avec le milieu II de Pringsheim dont la formule est donnée plus haut (voir p. 11). Ce milieu est ajusté à $\text{pH} = 8,00$ par addition d'une quantité convenable de CO_3K_2 .

Si on ensemence un tube contenant 10 à 12 cm^3 du milieu de Pringsheim avec 1 goutte de culture en milieu à l'asparagine-acétate de sodium (voir p. 17), le développement est excellent : formation en quelques jours d'un voile très épais de *Polytoma*. Le deuxième repiquage, s'il est effectué avec I ou V gouttes, est négatif ; avec X gouttes, donne une culture très riche (voile). Le troisième passage, effectué avec I ou V gouttes, reste négatif, *de même avec X gouttes*. Il est très probable que PRINGSHEIM s'est contenté d'observer le résultat du premier repiquage et n'a pas fait de passages en série dans son milieu à l'acétate d'ammonium. Il manque au milieu de Pringsheim beaucoup d'éléments reconnus comme indispensables aux organismes vivants et en particulier du fer. Nous avons pensé que l'absence de fer

pouvait être un des facteurs empêchant la culture ; pour le vérifier, nous avons constitué le milieu suivant :

MILIEU N° 3

Acétate d'ammonium . . .	2
Chlorure de sodium. . .	0,04
Sulfate de magnésium. . .	0,1
Phosphate bipotassique . .	0,2
Chlorure de calcium . . .	0,05 (ajouté après stérilisation)
Carbonate de potassium . .	q. s. pour pH = 8,00
Eau bidistillée	1.000

Avec le milieu n° 3, les résultats ont été exactement superposables à ceux obtenus avec le milieu de Pringsheim à l'acétate d'ammonium (voir p. 11). A partir d'un milieu à l'asparagine-acétate de sodium, premier repiquage positif si ensemencement fait avec I goutte, deuxième négatif avec I ou V gouttes, positif avec X gouttes, troisième impossible même avec X gouttes. Il peut arriver même que le deuxième repiquage soit négatif.

Si l'on ajoute au milieu n° 3 du chlorure ferrique (le chlorure ferrique est ajouté comme le chlorure de calcium, après stérilisation, de façon à ce qu'on obtienne une concentration de 0,005 pour 1.000), on peut avoir des repiquages en série. Toutefois, il faut remarquer que si les trois premiers passages en milieu avec fer sont toujours possibles avec des ensemencements de I goutte, les repiquages ultérieurs ne réussissent que si l'onensemence V et même parfois X gouttes de culture. Dans ces conditions, nous avons entretenu pendant 10 passages successifs une culture de *Polytoma*. Le développement était très abondant, voile très riche ; considérant ces 10 passages comme suffisamment démonstratifs en raison de la richesse des cultures, nous avons volontairement interrompu l'entretien de notre souche en milieu à l'acétate d'ammonium + fer.

Si, à partir par exemple de la deuxième culture en milieu n° 3 + fer, nous ensemençons du milieu 3 sans fer, cette troisième culture ne part que si l'ensemencement a été fait avec X gouttes. Avec I ou V gouttes : pas de culture. Rappelons que le troisième ensemencement en milieu avec fer réussit avec I goutte. Le deuxième repiquage sans fer, c'est-à-dire pour suivre notre

série ci-dessus, la quatrième culture de cette série, est négatif ou ne permet que des cultures très pauvres, même après un ensemencement de X gouttes. Il est donc indispensable d'ajouter au milieu 3 un notable quantité de fer pour permettre l'entretien indéfini de *Polytoma*, puisque les traces de fer qui existent certainement comme impuretés dans le milieu 3 ne suffisent pas à assurer la culture.

Il manque au milieu n° 3 + fer beaucoup d'éléments utiles sinon indispensables : zinc, manganèse, bore, arsenic, ... L'addition de sels de ces corps au milieu 3 n'a cependant amélioré en rien les conditions de développement des cultures et il est très probable que des traces de ces substances existent à l'état d'impuretés, traces suffisantes dans les milieux que nous utilisons. Les sels que nous avons employés n'ont en effet été soumis à aucune purification particulière. En tous cas, nous sommes convaincu que l'action du fer n'est pas due à la présence de traces de manganèse : l'addition de chlorure de manganèse au milieu n° 3 n'ayant pas permis la culture comme l'addition de sels de fer.

Ces expériences démontrent en tous cas avec la plus grande netteté que le fer est indispensable à *Polytoma uvella*, résultat qui n'est point fait pour surprendre puisque le fer est l'un des constituants constants des organismes vivants.

D'après MAINX (1929), les besoins en fer de beaucoup d'Algues sont si discrets que le caractère indispensable de cet élément ne se laisse pas démontrer par les méthodes ordinaires, par exemple : *Stichococcus bacillaris* (EILERS, 1927), les Conjuguées (CZURDA, 1924-1926) et les Eugléniens (MAINX, 1928). Pour d'autres espèces, la présence d'une certaine quantité de fer dissous est une des conditions d'une bonne croissance ... par exemple chez *Volvox* (USPENKI et USPENSKAJA, 1925), chez les Chlorelles (HOPKINS et WANN, 1926).

Dans le cas de *Polytoma*, l'absence de fer ne se traduit pas, comme dans le cas de *Chlorella sp.* étudié par HOPKINS et WANN, par un moins bon développement des cultures. La culture dans les milieux aux sels d'ammonium sans fer n'est pas possible. Nous n'avons pas étudié le rôle des autres éléments (Na, Ca, K ...), cette étude sortant des limites que nous avons fixées à ce travail.

Le « bios ». — On peut entretenir indéfiniment une culture de *Polytoma uvella* en milieu n° 1 à l'asparagine, acétate de sodium ou à la peptone-acétate de sodium en faisant l'ensemencement avec 1 goutte de culture. Nous avons vu que, dans les milieux à l'acétate d'ammonium, il faut semer X gouttes pour entretenir une souche. Il y a là un phénomène analogue à celui qu'on observe chez beaucoup d'organismes cultivés en milieu synthétique et en particulier chez les levures comme l'a montré WILDIERS dans son travail classique sur le « bios ». La présence d'une trace de substance azotée organique — apport d'une trace d'asparagine au premier repiquage par exemple — suffit en tout cas pour supprimer l'effet « bios » dans les cultures de *Polytoma* en milieu n° 3 sans fer. Au contraire le manque d'un élément minéral, comme le fer, suffit à faire apparaître l'effet « bios » : premier ensemencement possible à partir du milieu 3 à l'acétate d'ammonium, possible avec 1 goutte en milieu 3 + fer, nécessitant X gouttes en milieu 3 sans fer. Ce dernier cas s'explique facilement, un ensemencement large apportant la substance qui manque au milieu en quantité suffisante puisqu'elle agit à dose très faible.

Les levures cependant peuvent parfaitement se multiplier sans qu'intervienne l'effet « bios ». Les cultures sont simplement moins riches et se développent moins rapidement. Avec *Polytoma uvella* en acétate d'ammonium, il y a ou bien culture très riche, ou bien pas de culture du tout. Il est très probable que l'ensemencement large, pour *Polytoma* comme pour les levures, est suivi de la mort de nombreux organismes qui libèrent des substances organiques permettant le développement des survivants. Le fait que l'ensemencement large n'est indispensable que lorsque la source azotée est inorganique — sel d'ammonium — et n'est nullement nécessaire lorsque cette source azotée est un acide aminé, nous paraît appuyer fortement cette hypothèse.

Les sources carbonées organiques.

Une source carbonée organique indépendante de l'aliment azoté est indispensable à la nutrition de *Polytoma uvella*. L'acide acétique constitue la plus favorable. Il peut être remplacé par l'acide butyrique. L'acide formique est inutilisable,

l'acide propionique « un peu meilleur ». Les acides oxalique, malique, tartrique, succinique, citrique sont inutilisables (PRINGSHEIM, 1921).

Nous avons expérimenté la valeur nutritive des corps carbonés étudiés par PRINGSHEIM et de quelques autres pour essayer d'établir une relation entre la constitution chimique des sources carbonées et leur valeur alimentaire. Dans notre milieu n° 1, où l'aliment est fourni sous forme d'asparagine, nous avons supprimé l'acétate de sodium. Celui-ci a été remplacé par les corps suivants à la concentration de 2 pour 1.000.

MONOACIDES

Acides gras.

<i>Acide acétique</i>	$\text{CH}_3 - \text{COOH}$
» <i>propionique</i>	$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$
» <i>butyrique normal</i> . . .	$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$
» <i>isobutyrique</i>	$(\text{CH}_3)_2\text{CH} - \text{COOH}$
» <i>valérianique normal</i> . .	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3 - \text{COOH}$
» <i>caproïque normal</i> . . .	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4 - \text{COOH}$
» <i>œnanthylique normal</i> .	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5 - \text{COOH}$
» <i>caprylique normal</i> . .	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6 - \text{COOH}$
» <i>pélargonique normal</i> .	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$

Acides alcools.

<i>Acide lactique</i>	$\text{CH}_3 - \text{CHOH} - \text{COOH}$
---------------------------------	---

Acides cétones.

<i>Acide pyruvique</i>	$\text{CH}_3 - \text{CO} - \text{COOH}$
----------------------------------	---

Acides polyalcools.

<i>Acide glycérophosphorique</i> .	$\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH}_2)\text{OPO}_3\text{H}_2$
------------------------------------	---

DIACIDES

Diacides 1-2.

<i>Acide oxalique</i>	$\text{COOH} - \text{COOH}$
---------------------------------	-----------------------------

Diacides 1-4.

<i>Acide succinique</i>	$\text{COOH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$
» α - α -diméthylsuccinique .	$\text{COOH} - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{CH}_3)_2 - \text{COOH}$

Diacides alcools.

Acide malique.	$\text{COOH} - \text{CH}_2 - \text{CHOH} - \text{COOH}$
» tartrique	$\text{COOH} - \text{CHOH} - \text{CHOH} - \text{COOH}$

POLYACIDES

Acide citrique.	$\text{COOH} - \text{CH}_2 - \underset{\text{COOH}}{\text{COH}} - \text{CH}_2 - \text{COOH}$
-------------------------	--

ALCOOLS

Monoalcools.

Alcool méthylique	CH_3OH
» éthylique	$\text{CH}_3 - \text{CH}_2\text{OH}$

Dialcools.

Glycol	$\text{CH}_2\text{OH} - \text{CH}_2\text{OH}$
------------------	---

AMIDES

Acétamide	$\text{CH}_3 - \text{COONH}_2$
---------------------	--------------------------------

Les corps pouvant servir de source carbonée sont en italique.

Les acides ont été fournis sous forme de leurs sels de sodium. L'acide oxalique a été expérimenté à trois concentrations : 0,5, 1 et 2 pour 1.000. Les alcools ont été étudiés à diverses concentrations : V à XXX gouttes pour 10 cm³ de milieu.

Tous les corps étudiés peuvent être classés en deux catégories : *a*) corps pouvant servir d'aliment carboné : ce sont les acides acétique et butyrique ; *b*) corps ne pouvant servir d'aliment carboné : ce sont tous les autres corps cités ci-dessus.

Les milieux renfermant des corps de la catégorie *b* se comportent comme les milieux témoins qui sont des milieux totalement dépourvus de composé carboné organique indépendant. On observe parfois une légère multiplication au premier repiquage, mais les repiquages ultérieurs sont impossibles. Toutes les expériences négatives ont été refaites au moins deux fois, chaque fois avec de nombreux tubes. Notons que les *Polytoma* ensemencés peuvent survivre près d'un mois dans certains milieux (au tartrate, glycérphosphate ou succinate de sodium par exemple) ; *mais ils ne s'y multiplient pas*.

Quant aux corps de la catégorie *a*, ce sont, comme nous l'avons dit déjà, les acides acétique et butyrique.

L'acide butyrique permet, avec l'asparagine comme source azotée, de bonnes cultures de *Polytoma*. Il faut remarquer toutefois que les cultures sont toujours moins riches dans le milieu à l'asparagine-acide butyrique que dans le milieu asparagine-acide acétique.

Toutes les sources carbonées ont été étudiées dans les mêmes conditions en faisant varier la source azotée et en remplaçant l'asparagine par la cystéine ou par une « peptone pancréatique de muscle de bœuf peu dégradée ». Avec la peptone, les résultats obtenus sont exactement superposables à ceux obtenus avec l'asparagine.

Avec la cystéine, certaines précautions sont nécessaires. On sait en effet que de nombreux corps, l'acide pyruvique par exemple, sont oxydés en présence de cystéine. L'oxydation de l'acide pyruvique fournit de l'acide acétique. D'autres corps, les acides gras en particulier, sont également oxydés. Il est donc absolument indispensable d'étudier les milieux à base de cystéine dès leur préparation. Cette précaution étant observée, les résultats des essais des divers corps étudiés ont été les mêmes qu'avec l'asparagine et la peptone. Il faut toutefois noter que les milieux à la cystéine-acide butyrique permettent des cultures aussi riches que les milieux à la cystéine-acide acétique : formation rapide d'un voile de flagellés à la surface du milieu.

L'oxydation des composés carbonés en présence de cystéine peut être assez rapide. Par exemple, ensemblons un milieu à la cystéine-acide pyruvique, préparé le jour même avec 1 goutte d'une culture riche en cystéine-acétate de sodium. Jusqu'au 5^e jour, on note la présence de rares flagellés ; pas de multiplication. L'examen est encore négatif du 6^e au 15^e jour. Le 16^e jour, apparition de très rares flagellés. Le 19^e jour, culture assez riche. Un repiquage, effectué dans le même milieu datant de 20 jours avec 1 goutte de culture, donne en 4 jours une culture très riche, plus de 1.000 flagellés par millimètre cube, avec voile abondant, culture qui s'est maintenue jusqu'au 6^e repiquage dans le même milieu. Reportée dans un milieu cystéine-pyruvate de sodium récemment préparé, le développement de la culture s'arrête immédiatement.

On voit donc que de tous les corps utilisés, seuls, l'acide acétique CH_3COOH et l'acide butyrique $\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$ ont pu servir de source carbonée. Il est très remarquable que ni l'acide propionique $\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$, ni l'acide isobutyrique $(\text{CH}_3)_2\text{CH} - \text{COOH}$ n'aient pu être utilisés. Ces constatations nous amènent aux déductions suivantes : la possibilité d'utilisation de tel ou tel acide gras par *Polytoma* comme source carbonée *ne dépend pas du nombre d'atomes de carbone présents dans la molécule du corps considéré* :

		Atomes de C	Groupe- ments CH ₂
$\text{CH}_3 - \text{COOH}$, acide acétique.	utilisable .	2	0
$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$, acide propionique. .	inutilisable	3	1
$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$, acide butyrique	utilisable .	4	2
$\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{CH} - \text{COOH}$, acide isobutyrique . .	inutilisable	4	0

Cette possibilité est par contre en relation avec le nombre de groupements CH_2 . L'acide propionique qui ne renferme qu'un seul groupement CH_2 est inutilisable. L'acide butyrique l'est. L'acide isobutyrique à chaîne bifurquée ne l'est pas.

Cette étude nous permet simplement de dire qu'il faut, pour qu'un acide de la série grasse soit utilisable, qu'il renferme dans sa molécule, qui doit être à chaîne linéaire, moins de 5 atomes de carbone, un nombre pair de groupements CH_2 , ou pas de groupements CH_2 du tout. Ces conclusions, basées sur les résultats fournis par l'étude de quatre corps, peuvent sembler très fragiles. Nous verrons cependant que l'étude de la nutrition carbonée d'*Englena gracilis*, qui assimile les acides gras à 6 atomes de carbone, permet d'étendre et de généraliser cette hypothèse sur laquelle nous reviendrons ainsi que sur l'explication qu'il convient de donner à ce phénomène (voir p. 119).

Nous avons vu que PRINGSHEIM et MAINX (1926) ont trouvé que l'acide propionique et l'acide valériannique sont utilisables par *Polytoma* comme source carbonée. PRINGSHEIM et MAINX n'ont pas indiqué avec quelle dose de culture ils ensemençaient leurs milieux et s'ils ont effectué plusieurs passages dans un milieu donné. La discordance de nos résultats s'expliquerait

en tous cas très bien si PRINGSHEIM et MAINX n'avaient observé que les résultats des deux premiers ou du premier repiquage, qui nous ont donné parfois à nous-même des cultures pauvres.

Pour nous, les acides valérianique et propionique sont inutilisables. Nos expériences montrent d'autre part que ce n'est pas le nombre des atomes de carbone qui importe, comme le supposent PRINGSHEIM et MAINX, mais le nombre des groupements CH_2 (cas des acides butyrique et isobutyrique). Enfin, notons que si l'acide acétique constitue la meilleure source de carbone, ni l'acétamide ni l'acide phénylacétique ne sont utilisables.

Nous réservons pour la deuxième partie, chapitre I, la comparaison des besoins carbonés de *Polytoma* avec ceux des Bactéries et des Champignons.

La structure des composés azotés favorables.

Les connaissances que nous avons acquises relativement aux sources carbonées organiques, nous permettent d'établir une relation entre la structure des corps azotés et leur valeur alimentaire pour *Polytoma*. Nous croyons utile de donner ici la liste des acides aminés avec leur formule :

Acides monoaminés monobasiques.

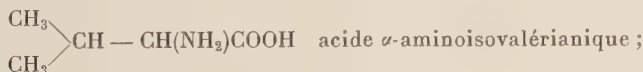
Glycocolle :



d. alanine :



d. valine :



l. leucine :



l. sérine :



Acides monoaminés bibasiques.

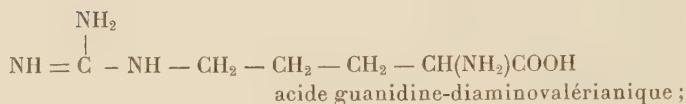
l. ac. aspartique :



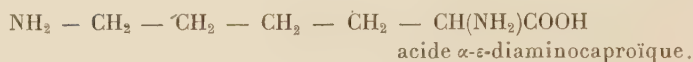
d. ac. glutamique :

*Acides diaminés monobasiques.*

Arginine :



Lysine :

*Série aromatique.*

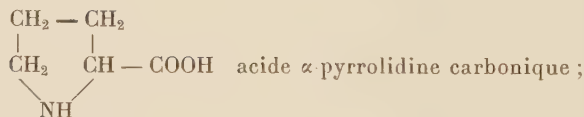
Phénylalanine :



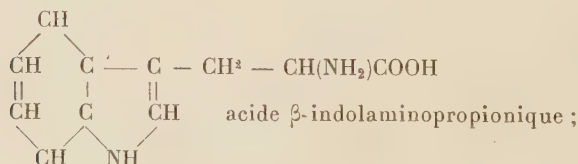
Tyrosine :

*Série hétérocyclique.*

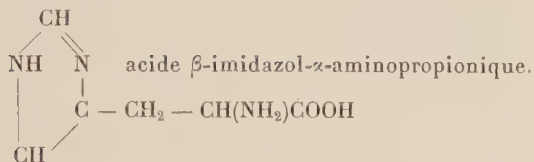
Proline :



Tryptophane :

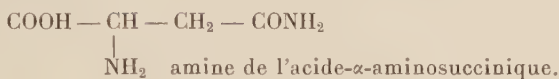


Histidine :



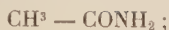
Amide acide aminé.

Asparagine :

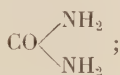


Amides.

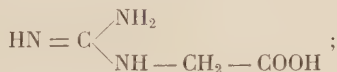
Acétamide :



Urée :

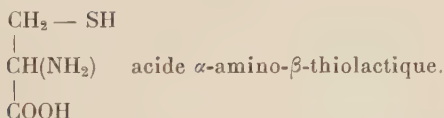


Glycocyamine :



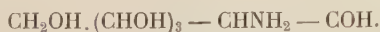
Acide aminé à noyau sulfuré.

Cystéine :



Acide aminé à noyau glucidique.

d. glucosamine :



Peut-on dégager de ces formules une relation entre la structure chimique des corps étudiés et la possibilité de leur utilisation comme source azotée par *Polytoma* ? Il nous faut considérer séparément chacun des groupes chimiques.

I. *Acides monoaminés monobasiques*. — Ce sont les dérivés α -aminés des acides acycliques.

Seul, parmi ceux que nous avons étudiés, le glycocolle, acide α -aminoacétique, constitue une bonne source azotée. Faisons remarquer tout de suite que l'acide acétique est la meilleure des sources de carbone pour *Polytoma*. Ajoutons également que si l'acide α -aminoacétique, $\text{CH}_2\text{NH}_2 - \text{COOH}$, constitue une excellente source de carbone, l'acétamide $\text{CH}_3 - \text{CONH}_2$ est inutilisable. Pour en revenir aux acides monoaminés monobasiques, disons que tous (sauf le glycocolle), alanine, valine, leucine, sérine, sont des dérivés α -aminés des acides propionique, isovalérienique, isobutylacétique et oxypropionique, tous acides gras inutilisables comme source carbonée.

Il semble donc que seuls les dérivés α -aminés des acides gras pouvant servir de source de carbone pour *Polytoma*, c'est-à-dire ceux qui renferment moins de 5 atomes de carbone par molécules et un nombre pair de groupements CH_2 (voir p. 36) peuvent constituer une source azotée favorable. Si cette conclusion est exacte, l'acide α -aminonobutyrique doit constituer une excellente source azotée pour *Polytoma uvella*, et l'acide α -aminoisobutyrique doit être inutilisable. Nous n'avons malheureusement pas pu nous procurer ces deux corps.

II. — *Acides monoaminés bibasiques*. — L'acide aspartique et l'acide glutamique sont les dérivés α aminés des acides succinique et glutamique. L'acide succinique est inutilisable comme source carbonée; l'acide glutamique n'a pas été étudié. Or, ni l'acide aspartique ni l'acide glutamique ne constituent une bonne source azotée pour *Polytoma* alors que l'asparagine, amide de l'acide aminosuccinique en est une des meilleures. Il est possible que la glutamine, amide de l'acide aminoglutamique, se révèle très supérieure à l'acide glutaminique.

III. — *Acides diaminés monobasiques. Acides de la série aromatique et de la série hétérocyclique*. — Tous ces corps, dérivés aminés pour la plupart d'acides acycliques ou de composés complexes des acides acycliques inutilisables pour *Polytoma* constituent de très mauvaises sources azotées.

IV. — *Cystéine et glucosamine*. — Ces deux corps doivent certainement, l'un à son radical sulfhydryle, l'autre à son radical glucide, des propriétés particulières. Ils sont les meilleures sour-

ces azotées pour *Polytoma*, mais sont trop isolés dans la série des acides aminés pour qu'on puisse établir une relation entre leur structure et leur valeur nutritive.

Le fait que, même avec le glycocolle comme aliment azoté, *Polytoma uvella* a besoin d'acide acétique, nous permet de conclure que l'attaque des acides aminés qui livrera NH_3 n'est pas une désamination réductive, laquelle donnerait, dans le cas du glycocolle de l'acide acétique. Cette attaque peut être soit une désamination hydrolytique au sens de NEUBAUER (VOIR NEUBAUER 1928), soit une désamination oxydative.

CHAPITRE II

GLAUCOMA PIRIFORMIS

(*Cilié Holotriche*)

Historique.

Quelques auteurs : TSUJITANI (1898), ŒHLER (1916-1924), ont isolé en culture pure un certain nombre de Protistes bactériophages, Amibes et Infusoires, tous à nutrition particulière obligatoire. PETERS (1921) a cru avoir réalisé la culture pure de *Colpidium colpoda* en milieu liquide. E. et M. CHATTON (1923 à 1931), au cours de leurs recherches sur le déterminisme de la sexualité chez les Ciliés, ont obtenu également la culture pure, sur bactéries tuées, de *Glaucoma scintillans* et la culture pure abactérienne de *Glaucoma piriformis*. Tous ces travaux sont examinés en détail dans un paragraphe spécial (p. 56). Il semble bien que *Glaucoma piriformis* soit le seul de tous les Ciliés étudiés jusqu'ici qui puisse se nourrir de substances liquides. Nous ne croyons pas qu'il ait été obtenu en culture pure avant nous (1923).

Isolement et purification.

La souche de *Glaucoma piriformis* a été obtenue en octobre 1922 dans une infusion de foin (1). Une première culture fut réalisée d'abord avec *Bacterium coli*. Une culture de 24 heures de *Bacterium coli* sur gélose ordinaire est émulsionnée en eau de robinet stérilisée et l'émulsion bactérienne ainsi obtenue stérilisée

(1) Nous avons cru tout d'abord avoir affaire à *Colpidium colpoda* ; cette erreur fut matérialisée dans notre première note en 1923, puis redressée dans la suivante en 1924.

par chauffage à 115° pendant 20 minutes. C'est dans cette émulsion plus ou moins diluée de bactéries tuées, qu'a été transporté un infusoire prélevé dans l'infusion de foin, l'infusoire ayant été préalablement lavé. Après quelques jours, le tube ensemencé renferme de nombreux ciliés. Cette première culture impure constitue un bon point de départ pour les tentatives de culture pure. Le milieu de culture, eau de robinet + bactéries tuées, renferme un minimum de substances dissoutes et est peu favorable au développement des bactéries qui ont pu être apportées avec l'infusoire. On a toujours intérêt à obtenir ainsi d'abord une culture « de départ » pauvre en bactéries,

Purification. — Il s'agissait de séparer complètement les ciliés des bactéries. Cette opération a été réussie par lavages.

Les lavages sont effectués dans une émulsion très diluée (une anse de platine chargée de bactéries dans 2 cm³) de *Bacterium coli* tué, en eau de robinet, de façon à ne pas soumettre l'infusoire au jeûne pendant les manipulations. La technique propre de ces manipulations de purification est la même que celle que nous avons utilisée pour purifier notre souche de *Polytoma uvella* (voir page 14). Les gouttes d'émulsion sont déposées sur des lames stérilisées au préalable dans des boîtes de Petri (chaleur sèche au four Pasteur, 1 heure à 180°). Le cilié est transporté dans l'une de ces gouttes d'émulsion bactérienne. Après un premier séjour de 10 minutes, il est pêché sous la loupe binoculaire à l'aide d'une pipette capillaire stérile et transporté dans un second bain. Les manipulations doivent être effectuées le plus rapidement possible. Notons que les chances d'infection d'une goutte d'eau ayant un étalement maximum de 0,5 cm. sont minimales. Après 8 lavages — 10 minutes de séjour dans chaque bain —, le cilié est transporté dans un tube renfermant l'émulsion de *Bacterium coli* stérilisée. Une culture s'étant développée au bout de quelques jours (décembre 1922), elle est repiquée dans divers milieux d'entretien. Les épreuves de pureté bactériologique ayant démontré l'absence de toute bactérie, c'est cette souche que nous avons entretenue et qui est actuellement encore entretenue à l'Institut Pasteur depuis plus de neuf années.

Nous ne chercherons pas à cacher que ce succès a été précédé de multiples insuccès et que, pendant les premiers mois de nos essais, ou bien les glaucomes étaient perdus pendant les mani-

pulations, ou bien les cultures que nous obtenions étaient impures.

Nous indiquerons à ce propos qu'il est indispensable d'utiliser du verre neutre pour la confection des pipettes. L'expérience montre que le pH d'un liquide neutre, aspiré dans une pipette de verre alcalin, varie en quelques secondes et atteint pour certains verres une valeur voisine de 9,00. Ce pH peut être supporté par certains ciliés, mais il constitue cependant une valeur limite et il est bon, en tous cas, de s'assurer, en aspirant dans une pipette une solution de bleu de bromothymol de $\text{pH} = 7,00$, que la teinte correspondante se maintient au moins pendant quelques minutes. Nous sommes persuadés que l'omission de cette précaution élémentaire peut être à l'origine de bien des insuccès.

Épreuves de pureté bactériologique. — Les épreuves ont été les mêmes que celles effectuées pour *Polytoma uvela* : ensemencements dans des milieux divers à 22 et 37° en aérobiose et anaérobiose : bouillon peptoné, bouillon-sang, gélose bactériologique peptonée ordinaire, gélose de MUSGRAVE et CLEGG, gélose au sang N. N. N., gélose de SABOURAUD, gélose de VEILLON en culot (voir pour plus de détails page 15).

Aucun des tubes ensemencés n'a montré le moindre développement de bactéries. Il n'est pas mauvais d'ailleurs de remarquer que nous entretenons nos cultures en milieu peptoné, donc très favorable à la plupart des bactéries. Lorsque le milieu est infecté, le développement bactérien est très rapide et les ciliés meurent au bout de peu de temps. Nous indiquerons que nous avons soumis nos cultures à l'examen de notre collègue WOLLMAN, que nous sommes heureux de remercier ici, et qui en a confirmé la pureté. D'autre part, avec S. NICOLAU, nous avons inoculé à diverses reprises des cultures dans le cerveau de Lapins sans provoquer le moindre trouble, et l'on connaît l'extrême sensibilité du cerveau du Lapin à l'infection bactérienne. Enfin, l'examen des cultures, soit direct, soit après centrifugation, n'a jamais montré la présence de bactéries, que ce soit *in vivo* ou sur des préparations de ciliés fixés et colorés par les méthodes les plus variées.

Caractères morphologiques et cytologiques de notre souche. — La souche que nous avons isolée a fait l'objet d'études mor-

phologiques de E. CHATTON, A. et M. LWOFF (1931) qui ont décrit en détail la ciliature buccale et sa genèse. Nous croyons inutile d'insister ici plus longuement sur cette question, la ciliature générale sera étudiée dans un mémoire séparé.

Milieux d'entretien.

a) *Milieux liquides.* — Dès que nous avons obtenu la culture pure de *Glaucoma piriformis* en milieu eau de robinet + *Bacterium coli* tué, nous l'avons portée en milieu liquide. Notre premier milieu liquide était constitué par du bouillon peptoné bactériologique ordinaire dilué : bouillon 1 partie, eau distillée, 2 parties ; pH = 7,2. Le cilié s'étant montré apte à s'y développer, nous avons depuis toujours entretenu notre souche en milieu liquide. Nous avons remplacé le bouillon dilué par de l'eau peptonée.

La formule que nous avons donnée en 1923 était la suivante :

Chlorure de sodium	0,5
Chlorure de potassium	0,01
Chlorure de calcium	0,02
Sulfate de magnésium	0,01
Phosphate acide de sodium	0,02
Peptone de Witte ou de caséine.	10
Eau distillée	1.000

En réalité une telle complexité est parfaitement inutile. La peptone apporte tous les sels nécessaires à la croissance et à la multiplication de *Glaucoma piriformis*. Nous nous servons actuellement du milieu peptoné suivant :

Peptone (pepsique d'arachide)	10
Chlorure de sodium	4
Eau bidistillée	1.000
Soude q. s. pour pH 7,00	

C'est en somme tout simplement de l'eau peptonée.

Choix de la peptone. — Au début de nos recherches, nous nous servions de la peptone de Witte ou d'une peptone de caséine. Actuellement nous utilisons soit la peptone de Chapo-

teaut (Paris) qui est une peptone pepsique de muscle, soit les peptones suivantes Vaillant (Paris) : peptone pepsique de muscle de bœuf (P. B. C.) peptone pancréatique de muscle de bœuf (5C), peptone pepsique d'arachide (1).

La peptone pepsique d'arachide donne d'aussi bons résultats que les autres peptones et son prix de revient est moins élevé. Elle a été utilisée pour la première fois en bactériologie par BERTHELOT (1930) et on trouvera dans le travail de cet auteur quelques renseignements à son sujet.

En dehors des solutions peptonées, on peut employer un autolysat de levure de boulangerie préparé de la manière suivante : placer à l'étude à 50° (on peut aller jusqu'à 55°, température qu'il est bon de ne pas dépasser) 250 gr. de levure de boulangerie émulsionnée dans 300 cm³ d'eau distillée. Après un temps de séjour à l'étuve qui varie suivant le degré d'hydrolyse que l'on désire obtenir — en 48 heures on a une hydrolyse suffisante — l'émulsion est amenée à 1 litre par addition d'eau distillée. Le liquide alors obtenu est additionné d'un blanc d'œuf, porté à l'autoclave 20 minutes à 120°, passé sur un linge au sortir de l'autoclave, puis filtré sur papier. Le liquide jaune ambré qui s'écoule est alors additionné de quatre fois son volume d'eau distillée, dans laquelle on a préalablement introduit les sels que l'on veut incorporer au milieu. Il peut être pratique, au sortir de l'étuve à 55°, de centrifuger simplement l'autolysat, ce qui permet une séparation complète et rapide des substances dissoutes. Après centrifugation, coller à l'œuf, porter à l'autoclave 20 minutes à 120°, filtrer, diluer, répartir.

Toutes ces peptones, peptone pepsique ou pancréatique de muscle, peptone pepsique d'arachide, autolysat de levure, donnent les mêmes excellents résultats. Dans le paragraphe consacré à l'étude du pouvoir de synthèse de *Glaucoma piriformis*, nous aurons l'occasion de parler de la constitution de ces peptones et du degré d'hydrolyse favorable.

Ensemencé avec une goutte d'une culture riche, un tube renfermant 10 cm³ de milieu montre en quelques jours de nombreux ciliés en division. La densité de la culture croît très rapidement.

(1) Les lettres ou chiffres entre parenthèses indiquent simplement la désignation de ces peptones chez le fabricant.

Mais un certain nombre de *Glaucoma* meurent et tombent au fond du tube pendant que d'autres continuent de se diviser. Au point optimum de développement, une bonne culture renferme environ 200 ciliés par millimètre cube. La culture est parfaitement visible à l'œil nu et, en agitant un tube, éclairé convenablement, on voit un nuage de petits corpuscules réfringents. Puis, très rapidement, une proportion importante de ciliés meurent au bout d'un mois, le tube présente à sa partie inférieure un magma blanchâtre constitué par des cadavres de *Glaucoma piriformis* en autolyse. A la partie supérieure, on voit encore quelques individus mobiles; il y en a une dizaine par centimètre cube. Même au deuxième mois, on peut encore voir des infusoires en division. Mais il est rare que dans un milieu peptoné on trouve des ciliés vivants après le quatrième mois. Pour assurer l'entretien des cultures, nous pratiquons un ensemencement tous les mois, exactement avec les mêmes précautions qui ont été longuement exposées à propos de *Polytoma uvella* (voir p. 18).

Nous avons pu enfin cultiver (12 passages) *Glaucoma piriformis* dans un milieu à base de peptone épuisée par l'éther.

La peptone, « peptone trypsique de muscle », est placée dans la cartouche d'un appareil de Soxhlet et lavée à l'éther pendant six jours. Le milieu confectionné avec cette peptone, comme avec une peptone normale, a permis exactement le même abondant développement que le milieu à la peptone normale. Si nous considérons que, dans un mélange d'albumoses, de peptones vraies et d'acides aminés tel que celui qui constitue les « peptones », l'éther a dissous tous les lipides, nous pouvons conclure que *Glaucoma piriformis* fait la synthèse de tous ses constituants lipidiques ou lipoprotéiques.

Milieux solides. — a) *Gélose.* — La gélose nutritive ordinaire des bactériologistes permet, si elle ne renferme pas trop de chlorure de sodium, le développement de *Glaucoma piriformis*, fait que nous avons constaté en 1922 à notre première épreuve de pureté bactériologique. Ayant remarqué à la surface de la gélose la présence de petites colonies brillantes, nous avons immédiatement pensé à des colonies bactériennes. Leur examen microscopique montra qu'elles étaient constituées uniquement par des infusoires. Ces colonies ne renferment jamais qu'une seule

assise de *Glaucoma*. Considérablement aplatis, ceux-ci sont serrés les uns contre les autres et présentent un profil polygonal. Leur épaisseur peut s'abaisser jusqu'à 5 μ . Il est manifeste qu'un organisme piriforme que l'on force ainsi à prendre la forme d'une galette subit à volume égal une augmentation considérable de sa surface. De calculs que nous avons effectués, nous pouvons conclure que, dans ces conditions de culture sur gélose, la surface du cilié a approximativement doublé. La comparaison de l'écartement des stries ciliaires d'un individu normal et d'un individu aplati sur gélose confirme ce calcul.

Les ciliés situés sur la gélose ne sont pas au contact de l'air, mais sont immergés dans une très mince couche de liquide, fait qu'il était logique de supposer *à priori* et dont la démonstration est apportée par la constatation suivante : si l'on fait le vide dans le tube de gélose les glaucomes restent intacts.

Les mouvements ciliaires sont pratiquement inhibés sauf sur le bord libre de l'infusoire, et la progression, extrêmement lente, semble se faire grâce à la formation de proéminences, qui ne sont naturellement en rien comparables aux pseudopodes des Amibes, mais paraissent formées par l'action du mouvement ciliaire.

Reportés en milieu liquide, les *Glaucoma* se mettent à nager activement. Ils conservent quelque temps leur forme aplatie facile à observer lorsque le cilié, en raison de sa nage hélicoïdale, se présente de profil, mais ne tardent pas à reprendre leur forme normale.

Pour obtenir des cultures sur milieu solide, le mieux est d'incorporer, au milieu liquide peptoné ci-dessus mentionné (p. 45), quinze ou vingt grammes pour 1.000 de gélose.

b) *Gélatine*. — Si l'onensemence les *Glaucoma* à la surface de la gélatine-bouillon inclinée, on note la formation, en quelques jours, à la surface du milieu, de petites colonies blanches. Un examen attentif montre que les colonies ne font pas saillie à la surface du milieu, mais sont au contraire situées dans la profondeur de la gélatine. *Glaucoma piriformis* liquéfie donc la gélatine. Mais la surface du milieu gélatiné se desséchant rapidement, le développement des ciliés s'arrête. Si l'ensemencement a été abondant, il se développe une culture importante dans le liquide ensemencé et il se produit alors une liquéfaction massive

de la gélatine. Cette liquéfaction a lieu aussi dans les tubes de gélatine en culot, après inoculation, par piqure, des ciliés dans la gélatine.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux de MESNIL et MOUTON (1903) qui ont extrait des Paramécies une diastase liquéfiant la gélatine et la fibrine.

c) *Milieux aux organes stérilisés.* — Pour l'entretien d'une souche de *Glaucoma piriformis* il est avantageux d'utiliser des milieux qui permettent une très longue survie des ciliés et évitent ainsi l'obligation des repiquages fréquents.

Mettre dans un tube à essais des fragments de 1 ou 2 cm³ de foie ou de cerveau de lapin ; recouvrir d'eau distillée, 8 à 12 cm³ suivant la contenance des tubes ; boucher au coton ; stériliser 20 minutes à 120°. Après ensemencement, les tubes sont capuchonnés et sont conservés soit à la température du laboratoire, soit à la glacière (8°). Les cultures se maintiennent vivantes dans ces conditions de 1 à 2 ans au minimum. Nous avons observé une fois un tube ensemencé depuis plus de quatre ans et qui montrait encore des glaucomes en excellent état, très mobiles. Ces milieux, surtout le milieu au foie, permettent d'assurer l'entretien des cultures avec un seul repiquage annuel.

Nutrition particulière et nutrition diffusive.

Dans les conditions naturelles, *Glaucoma piriformis* se nourrit d'éléments figurés, Bactéries, Levures, etc. Contrairement à tous les ciliés libres étudiés jusqu'à ce jour (voir p. 56), il possède la propriété de se nourrir de substances dissoutes. Nous avons pensé tout d'abord (1923) que dans les milieux liquides ou solides à base de peptones, la nutrition était purement diffusive et que l'absorption se faisait uniquement par voie ectoplasmique.

On sait que chez les Ciliés il y a un passage continu d'eau à travers la pellicule, eau qui est éliminée par la ou les vacuoles pulsatiles avec très probablement des produits d'excrétion. Cette élimination d'eau est constante dans les conditions normales et se produit même en l'absence de formation de vacuoles digestives. On peut dès lors admettre que certains Infusoires peuvent

laisser dialyser à travers leur pellicule des protides suffisamment hydrolysées comme les solutions de peptones que nous utilisons.

Nous avons vu d'ailleurs (p. 48) que, dans les milieux de culture, il y a diffusion de diastases protéolytiques et il est très probable que les produits d'hydrolyse des polypeptides complexes, peptides simples abiurétiques, qui se forment dans le milieu sont les mêmes que ceux qui résultent de l'action des diastases dans les vacuoles digestives. Si l'on admet cette hypothèse, on ne trouve aucune difficulté théorique à admettre également que ces peptides simples qui, dans les conditions normales, passent de la vacuole digestive dans le cytoplasme, puissent passer directement du milieu de culture dans le cytoplasme en traversant la membrane externe. Cette nutrition diffusive aux dépens des peptides est celle de tous les Trypanosomides (voir p. 73) qui, dépourvus de bouche, absorbent directement les aliments dissous dans le milieu de culture. C'est aussi celle d'*Euglena gracilis* à l'obscurité, *Polytoma uwelli*, *Chlamydomonas agloëformis* et *Hæmatococcus pluvialis* qui peuvent également absorber des polypeptides.

Le fait que les peptides peuvent traverser la membrane externe de certains Flagellés, ou des Euglènes, nous paraît donc bien démontré.

En ce qui concerne *Glaucoma piriformis* qui possède une bouche parfaitement fonctionnelle, la démonstration du passage des peptides à travers la membrane est difficile à fournir. Nous avons écrit en 1923 que les glaucomes en milieu liquide ne présentent pas de vacuoles digestives. Cela est en partie inexact. Si, dans une culture en milieu liquide, on trouve toujours quelques organismes sans vacuoles, la majorité des infusoires renferment des vacuoles digestives ainsi que nous l'avons reconnu par la suite (1925). Ces vacuoles ne sont jamais nombreuses, 1 à 5 par cilié environ. Certaines d'entre elles renferment parfois un ou deux petits granules, mais la plupart ne contiennent aucun élément figuré : leur contenu est entièrement liquide. L'existence de telles vacuoles a d'ailleurs été déjà signalée chez les Protozoaires. EDWARDS a réussi à provoquer leur formation chez certaines Amibes par l'action de sels divers. SCHEVIAKOFF a signalé leur existence chez les Paramécies et WALLENGREN chez *Colpidium*.

Pour BOZLER (1922), l'existence de particules solides ou tout au moins d'une certaine viscosité du milieu serait indispensable à la formation des vacuoles, les particules solides ou le liquide visqueux agiraient comme excitants mécaniques sur la partie de l'endoplasme située au fond du cytopharynx.

L'existence de vacuoles à contenu liquide ne saurait donc être mise en doute chez *Glaucoma piriformis*. Toutefois, il est difficile, en ce qui concerne leur formation, d'éliminer l'action possible de très petites particules figurées, car il est pratiquement impossible d'obtenir des solutions de peptones optiquement vides. Cependant, les ciliés qui se développent sur la gélose ne présentent pas de vacuoles. Ils s'accroissent et se multiplient néanmoins. L'existence d'une nutrition purement diffusive chez *Glaucoma piriformis* sur milieux solides nous paraît démontrée par ces constatations.

D'autre part, le petit nombre de vacuoles digestives dans les ciliés en milieu liquide, opposé à leur active multiplication, le fait que la nutrition diffuse aux dépens de polypeptides existe chez de nombreux Protistes (Chlamydomonadinés, Eugléniens, Trypanosomides) nous conduit à penser que *Glaucoma piriformis* pourrait présenter une telle nutrition diffusive à travers la membrane même, en milieu liquide.

Influence d'extraits d'organes sur la multiplication de « Glaucoma piriformis ».

En 1908, NOWIKOFF annonçait que l'extrait thyroïdien accélère la vitesse de multiplication des Paramécies. Ces résultats ont été confirmés depuis par la plupart des auteurs.

En particulier, SCHUMWAY (1927) tire de ses recherches la conclusion que l'émulsion de thyroïde crue, la thyroïde bouillie, et la suspension de poudre du commerce, provoquent une accélération constante de la vitesse de division des Paramécies et que cette accélération est due à une hormone « remarquablement stable ».

ABDERHALDEN et SCHIFFMANN (1922), qui ont fait agir sur les Paramécies des extraits de glandes diverses concluent que les « optones » de thyroïde, de thymus et de testicule augmentent,

alors que celles de corps jaune et d'hypophyse diminuent la vitesse de division des Paramécies. Cependant CORI (1923), constate que la poudre de thyroïde accélère la division tandis qu'une solution équivalente de thyroxine ne l'accélère que très peu.

POUR RIDDLE et TORREY (1923), la thyroxine diminuerait plutôt légèrement la vitesse de division, mais l'activité excrétrice serait augmentée. Enfin, WOODRUFF et SWINGLE (1924) montrent que l'on obtient la même accélération de la division avec du muscle qu'avec les glandes thyroïde, pinéale et pituitaire. L'accélération produite par la thyroïde est due, pour eux, à l'apport de matériaux nutritifs dans le milieu de culture : apport direct, les infusoires absorbent des fragments de thyroïde, et indirect, les infusoires ingèrent les bactéries qui se développent rapidement dans l'infusion de foin additionnée de thyroïde.

Les conclusions de WOODRUFF et SWINGLE nous paraissent conformes à la réalité des faits. La plupart des auteurs ont en effet complètement négligé le facteur « nutrition » proprement dit pour n'envisager que l'action accélérante des extraits. Or, dans une infusion de foin, les ciliés se nourrissent de bactéries et il est évident que si l'on ajoute au milieu des matériaux nutritifs — émulsion de glande — on favorise la pullulation des bactéries. En outre, comme le font très bien remarquer WOODRUFF et SWINGLE, les ciliés peuvent se nourrir directement de fragments de tissus.

Nous avons repris la question de l'accélération de la multiplication en culture pure (1925). Contrairement à tous les auteurs qui précèdent, nous avons expérimenté avec des cultures bactériologiquement pures en milieu peptoné. Nous nous sommes servi d'extraits Choay, extraits d'organes desséchés à froid dans le vide. Les produits suivants ont été essayés : extraits de thyroïde, testicule, ovaire, surrénale, corticale, surrénale médullaire, surrénale totale, moelle osseuse, hypophyse, thymus.

Pour chaque expérience on ensemence avec une goutte d'une culture homogène de *Glaucoma piriformis* : 1° un tube de milieu peptoné ; 2° un tube de milieu peptoné additionné d'extrait (1/2 cm³) ; 3° un tube de milieu peptoné additionné de la même quantité d'extrait (1/2 cm³), chauffé 20 minutes à 120°. On note la densité de la culture dans les jours qui suivent.

Dans les milieux additionnés d'extraits, la multiplication est légèrement plus élevée que dans le milieu témoin peptoné mais il n'y a aucune différence d'action entre les extraits frais ou chauffés, aucune différence non plus entre les divers extraits utilisés. Nos expériences montrent que tous les extraits d'organes, chauffés ou non, accélèrent également la multiplication de *Glaucoma piriformis*. Nous adoptons entièrement les conclusions de WOODRUFF et SWINGLE que l'accélération constatée est due à l'apport de matériaux nutritifs dans le milieu.

Toutefois, nous n'éliminons pas l'hypothèse que les principes actifs de certaines glandes de Mammifères puissent accélérer le métabolisme des ciliés. Nous constatons simplement qu'une telle action n'a pas été démontrée. Elle le sera lorsque, expérimentant avec des cultures bactériologiquement pures, on aura fait agir sur les ciliés, non pas des extraits totaux qui apportent des matériaux nutritifs, mais les principes actifs isolés.

Les expériences de CORI citées plus haut montrent que la thyroxine, comparativement à la poudre de thyroïde, n'accélère que très peu la division des Infusoires.

Eclectisme trophique et potentialités pathogènes.

Glaucoma piriformis est un Cilié à vie libre. Il peut cependant se comporter en véritable parasite, pénétrer, probablement à la faveur d'une blessure, dans des organismes aquatiques vivants, se multiplier dans leur cavité générale en se nourrissant de leurs tissus et entraîner la mort de l'hôte.

En 1922, MAC ARTHUR découvre des larves de *Theobaldia annulata* parasitées par *Glaucoma piriformis*. Les ciliés se multiplient rapidement dans les larves qui ne tardent pas à mourir. WENYON (*in Traité*, p. 1183) a pu cultiver le *Glaucoma* de MAC ARTHUR dans divers milieux (cultures impures).

En 1922 également, PENARD (p. 122) décrit un *Glaucoma parasiticum*, trouvé dans les branchies de *Gammarus pulex*. Il s'y nourrit des tissus de l'hôte. PENARD fait remarquer que son *G. parasiticum* rappelle d'assez près *G. piriformis*. WENYON considère qu'il ressemble beaucoup à *Glaucoma piriformis*. C'est aussi notre avis. Mais la question de l'identité des deux espèces

ne pourra être résolue qu'après l'étude comparative d'individus imprégnés à l'argent.

En 1923, nous avons montré que *Glaucoma piriformis*, inoculé dans la cavité générale de la chenille de la mite des abeilles, *Galleria mellonella*, détermine une infection mortelle. Une trentaine de chenilles avaient été inoculées qui, toutes, sont mortes en 8 à 15 jours suivant la dose injectée. Les injections avaient naturellement été faites avec des cultures pures en milieu peptoné.

On peut suivre la multiplication très rapide des ciliés dans le sang. Peu de temps avant la mort, le sang de la chenille ne renferme plus de leucocytes, nombreux à l'état normal, mais seulement de très nombreux Glaucomes. La nutrition des ciliés est phagocytaire et ils renferment maints débris cellulaires et des globules de graisse provenant très probablement du corps gras de l'hôte.

Quelques mois plus tard (1923), avec MARC TREILLARD, au cours d'une séance de travaux pratiques du cours de Microbiologie de l'Institut Pasteur, nous constatons la présence de nombreux ciliés dans des larves de *Chironomus plumosus* provenant des environs de Paris. L'étude sur le vivant, après coloration nucléaire, et aussi après la mise en évidence du système ciliaire par la cyanochine suivant la méthode de BRESLAU, n'a révélé aucune différence avec *Glaucoma piriformis*. Une seule particularité cytologique : on trouve dans le cytoplasme un grand nombre de grains d'un pigment ocre, probablement un dérivé de l'hémoglobine du sang de la larve de Chironome (1).

Certaines larves, très peu parasitées, ont montré une infection dense 48 heures plus tard et TREILLARD et LWOFF en ont conclu que l'évolution de l'infection, depuis la pénétration, vraisemblablement d'un seul infusoire, jusqu'à la mort de l'hôte, devait durer une dizaine de jours.

En 1926, H. EPSTEIN a décrit une infection générale à *Glaucoma* chez des embryons de 7 mm. de long d'*Abramis*

(1) WOODCOCK et LODGE (1921) ont fait connaître le premier exemple de pigment dérivé de l'hémoglobine chez un Cilié : *Haematophagus magapteræ* W. et L. qui se nourrit du sang de Baleine et qui renferme également un pigment ocre.

brama L. (1) d'un étang des environs de Moscou. Il paraît bien s'agir là-aussi de *Glaucoma piriformis*.

En 1929, GRASSÉ et DE BOISSEZON constatent la présence de Ciliés sur des coupes d'un *Culex* sp. femelle et n'hésitent pas à en faire le type d'un genre nouveau : *Turchiniella culicis*. Tous les travaux cités ci-dessus (MAC ARTHUR, PENARD, LWOFF, TREILLARD et LWOFF) avaient échappé à GRASSÉ et DE BOISSEZON ainsi que l'a fait remarquer F. MESNIL (*in Bull. Inst. Pasteur*, t. XXVII, 1929, 1005).

En 1930, DE BOISSEZON reproduit *in extenso* la note de GRASSÉ et DE BOISSEZON. Il ajoute cependant à la liste des Ciliés parasites « le cilié de MAC ARTHUR dans la larve de *Theobaldia annulata* qui est d'un genre voisin de *Cyclidium* et de *Pleuronema* » ... et ... « *Glaucoma piriformis* signalé par TREILLARD et LWOFF, 1923, dans la cavité générale des larves de Chironome ». DE BOISSEZON semble ignorer les observations de WENYON, 1926, sur le cilié de MAC ARTHUR. Il n'est pas douteux cependant que ce cilié, comme l'affirme WENYON, soit bien un *Glaucoma* et non un *Cyclidium* ou un *Pleuronema*. BOISSEZON écrit ensuite : « Aucun de ces organismes ne présente de ressemblances bien nettes avec *Turchiniella culicis* ». Il est probable que si M. DE BOISSEZON avait eu l'occasion de rencontrer *Glaucoma piriformis*, il eût fait immédiatement le rapprochement qui s'impose d'après les figures de GRASSÉ et DE BOISSEZON eux-mêmes. Etant donnés les documents fournis par ces auteurs, il n'y a aucune raison actuellement pour ne pas considérer *Turchiniella culicis* comme un simple *Glaucome*, aucun caractère différentiel sérieux du genre *Turchiniella* n'ayant été fourni. Le cilié décrit par GHOSCH (1925) dans l'hémocoele de *Culicoïdes peregrinus* sous le nom de *Balantidium knowlesi*, tout comme *Turchiniella*, nous semble être un *Glaucome*.

Sans vouloir insister sur la légèreté qu'il y a de la part d'un auteur à décrire des genres nouveaux de Ciliés uniquement

(1) Premier cas d'infection généralisée d'un Poisson par un Cilié. D'après des coupes, EPSTEIN a en effet constaté que les Infusoires se trouvaient dans le sang — sinus de Cuvier, cœur, — et que par la voie sanguine, ils atteignaient tous les organes : yeux, cerveau... L'infection naturelle atteignait 2 à 3 pour cent des larves. L'infection expérimentale n'a pas réussi.

d'après des coupes, nous tenons à faire remarquer combien il est préférable de se livrer à un sérieux examen de l'infusoire vivant, avec le contrôle, actuellement indispensable, de l'étude de la ciliature après imprégnation à l'argent.

L'examen des faits qui précèdent montre que *Glaucoma piriformis* possède des potentialités pathogènes étendues. Il suffit, comme nous l'avons dit plus haut, qu'un seul cilié pénètre à la faveur d'une blessure, dans le sang d'une larve aquatique d'Insecte, pour qu'il s'y nourrisse et s'y développe. Si l'infusoire a pénétré dans une nymphe près de se métamorphoser, on conçoit qu'on puisse le trouver dans l'organisme adulte. L'infestation de *Galleria mellonella* que nous avons réalisée apporte en faveur de cette conception un argument important.

Le cas de *Glaucoma piriformis* ne paraît pas être un cas isolé. MERCIER et POISSON (1923) ont en effet décrit un cas de parasitisme d'une larve de *Nepa cinerea* par des *Colpoda* sp. Nous ne parlerons pas des *Ophryoglena* et des *Lambornella* qui paraissent bien être des Ciliés parasites et non des Ciliés libres pénétrant dans l'hôte à la faveur d'une lésion cuticulaire.

Mais la très forte majorité des cas décrits jusqu'ici se rapportent à *Glaucoma piriformis*, ce qui s'explique facilement par le large éclectisme trophique que présente cet infusoire qui, à beaucoup d'égards, est une forme très particulière ainsi que l'ont fait remarquer E. et M. CHATTON dans leurs travaux sur la physiologie comparative des Ciliés (1923-1931).

Dans les conditions naturelles, tous les Ciliés libres qui possèdent une bouche se nourrissent de particules figurées qu'ils entraînent dans leur cytoplasme grâce aux mouvements de la ciliature buccale (ciliés du type *Paramæcium*) ou qu'ils ingèrent directement (type *Spathidium*).

Nous avons montré que *Glaucoma piriformis* peut utiliser les matériaux nutritifs dissous. Il paraît s'agir là d'un cas exceptionnel et pour le moment unique.

La nutrition des phagotrophes obligatoires.

On a pu isoler en culture bactériologiquement pure un certain nombre de Ciliés et d'Amibes, à nourriture particulière.

TSUJITANI, en 1898, réussissait pour la première fois la cul-

ture pure d'une Amibe indéterminée qu'il nourrissait de bactéries tuées.

Depuis 1898, plusieurs auteurs, en particulier MOUTON (1901), ont réalisé des cultures pures mixtes de diverses Amibes, c'est-à-dire des cultures d'une espèce donnée d'amibe avec une espèce donnée de bactérie ou de levure.

En 1916, RUD. EHRLER réussissait de nouveau à obtenir la culture pure d'une Amibe : *Hartmannella aquarum* JOLLOS et de *Vahlkampfia magna* JOLLOS, qu'il nourrissait de *Bacterium coli*, de Sarcines ou de Levures tués par chauffage 1 heure à 130°. En 1919, il réalisait la culture pure de deux Flagellés, *Bodo* sp. et *Prowazekia* sp. et de deux Ciliés, *Colpoda steini* et *Colpidium campylum*, ainsi que *Colpoda cucullus*. Les Flagellés et *Colpoda cucullus* peuvent être entretenus par passages successifs, indéfiniment sur milieux renfermant des bactéries tuées par la chaleur. (EHRLER a utilisé également des suspensions d'organes broyés ou de tissu musculaire finement pulvérisé.

La souche de *Colpidium campylum* obtenue en culture pure a été perdue au bout de quelques mois. Elle ne se multipliait pas lorsqu'elle était nourrie de *Bacterium coli* tués, alors qu'elle utilisait parfaitement les *Bacterium coli* vivants. *Colpidium campylum* ne se développait pas non plus dans les milieux aux organes favorables pour *Colpoda steini*. EHRLER a fait un certain nombre d'essais pour remplacer les bactéries tuées par des précipités d'albumine, de gélatine ou de peptone obtenus par l'action d'une solution de tannin. Ces essais ont été négatifs.

Toutes les tentatives en vue d'obtenir le développement des organismes, *Hartmannella*, *Valkampfia*, *Bodo*, *Prowazekia*, *Colpoda*, dans des milieux de culture liquide ont échoué.

Par exemple, si l'onensemence une souche pure d'amibe entretenue sur bactéries tuées sur de la gélose au sérum, glucosée, les amibes mangent les bactéries introduites par l'ensemencement. Il y a donc au début une légère multiplication qui s'arrête rapidement. Au 8^e jour, toutes les amibes sont mortes : on n'obtient pas de départ de la culture en y ajoutant alors des bactéries tuées.

Si l'onensemence avec quelques gouttes d'une culture de *Colpoda steini* un tube de gélose-bouillon, on observe au début une multiplication des ciliés. Un deuxième repiquage dans le même

milieu montre de très rares ciliés ; au troisième repiquage, on n'en trouve plus du tout. Les résultats sont identiques avec les cultures de *Bodo* et de *Prowazekia*.

Il résulte donc des travaux d'OEHLER que les Protozoaires qu'il a étudiés : *Vahlkampfia magna*, *Hartmannella aquarum*, *Bodo* sp., *Prowazekia* sp., *Colpoda steini*, *Colpidium campylum* et *Colpoda cucullus*, sont incapables de se nourrir de substances dissoutes. La manière rigoureuse dont ont été faites les épreuves de stérilité ne peut laisser aucun doute sur la pureté des cultures d'OEHLER. D'autre part, nous considérons comme tout à fait démonstratives les expériences relatées ci-dessus où ce même auteur montre l'impossibilité d'entretenir des cultures en eau de condensation de gélose, en bouillon... D'ailleurs, E. et M. CHATTON aux cours de leurs recherches sur le déterminisme de la sexualité des Ciliés, ont réalisé des cultures pures sur bactéries tuées — cultures « léthobactériennes » pour employer leur propre expression — de nombreux infusoires : *Glaucoma piriformis*, *Glaucoma scintillans*, *Colpidium campylum*. De tous ces infusoires, seul, *Glaucoma piriformis* a pu se développer en milieu peptoné. Aucun des autres ciliés étudiés (communication orale de résultats inédits de E. et M. CHATTON) ne se développe en milieu peptoné. Tous ont besoin d'aliments figurés : de bactéries dans le cas particulier. Les expériences de E. et M. CHATTON confirment donc les résultats d'OEHLER relatifs à *Colpidium campylum* et les étendent à *Colpidium colpoda*, *Glaucoma scintillans* et *Paramœcium*. Le fait que le milieu peptoné qui a été proposé comme nourriture liquide à tous ces organismes a permis la culture de *Glaucoma piriformis* témoins donne encore plus de valeur à cette démonstration.

Certains Flagellés, parasites intestinaux comme les *Trichomastix*, sont également des phagotrophes obligatoires. Leur culture pure a été réalisée pour la première fois par E. CHATTON (1918) et il ne semble pas qu'elle ait été réussie de nouveau par la suite. La souche de CHATTON est toujours entretenue au laboratoire de Protistologie de l'Institut Pasteur. Toutes les épreuves auxquelles nous l'avons soumise ont confirmé sa pureté bactériologique.

CHATTON a défini ainsi les conditions de la culture du *Tricho-*

mastix du Gecko : acidité, anaérobiose, nutrition phagocytaire, et son milieu est constitué par du bouillon acide (celui que nous employons a un pH voisin de 5,9), sous huile de vaseline, additionné de sang frais ou d'organes en autolyse aseptique. Même en bouillon peptoné, la présence d'aliments figurés (hématies, fragments d'organes) est indispensable. Le fait que dans le milieu à l'œuf du type Dorset comme ceux qui servent à la culture des *Entamoeba*, les *Trichomastix* en culture impure se passent parfaitement de sang et peuvent être entretenus indéfiniment, permet d'éliminer l'hypothèse d'une action « activante » du sang, comme celle que l'on observe dans la culture des Trypanosomides.

Acanthamoeba castellanii.

Nous avons pu étendre les conclusions d'EHLE et de E. et M. CHATTON à une amibe, *Acanthamoeba castellanii* DOUGLAS. La culture pure de cette *Hartmannellina* a été réalisée par CASTELLANI qui a bien voulu en confier l'étude au laboratoire de Protistologie de l'Institut Pasteur. Elle a déjà fait l'objet d'un travail cytologique de VOLKONSKY (1931).

Acanthamoeba castellanii se nourrit parfaitement de bactéries tuées ainsi que l'a constaté CASTELLANI en 1930. Nous avons pu l'entretenir sur bacilles paratyphiques A ou B. Les bactéries nous ont été aimablement fournies par le professeur LEGROUX sous forme de corps bactériens secs. La poudre blanche que ceux-ci constituent est émulsionnée dans de l'eau distillée et l'émulsion stérilisée 20 minutes à 115°. Le milieu aux organes stérilisés si favorable à *Glaucoma piriformis* (voir p. 49) permet d'obtenir des cultures extrêmement riches d'*Acanthamoeba*, amibes confluentes, se conservant vivantes plusieurs mois. Enfin, nous avons étudié la possibilité de l'utilisation des milieux peptonés (formule pour *Glaucoma*, p. 45). Le premier ensemencement, fait largement à partir d'une culture sur bacille paratyphique B tué a donné une culture riche. Au deuxième repiquage la culture a été beaucoup moins abondante, et pauvre au troisième. Ces constatations sont tout à fait superposables à celles d'EHLE que nous venons d'exposer. S'il est possible d'entretenir *Acan-*

thamæba castellanii dans les milieux peptonés, la culture en tout cas est très pauvre et se fait certainement aux dépens de granules, peu nombreux il est vrai, mais toujours présents, dans ces milieux. Il nous paraît certain qu'*Acanthamæba castellanii*, contrairement à *Glaucoma piriformis*, et comme *Hartmannella aquarum*, *Vahlkampfia magna*, *Colpidium colpoda* et *C. campylum*, *Colpoda steini* et *C. cucullus*, *Glaucoma scintillans*, *Paramæcium* sp., est un phagotrophe obligatoire.

Il résulte donc des travaux d'ÆHLER, des CHATTON et de nos constatations que toutes les Amibes, Flagellés (1), Ciliés libres étudiés jusqu'à ce jour doivent obligatoirement se nourrir de matériaux figurés et ne peuvent utiliser les substances dissoutes.

Glaucoma piriformis est la seule exception connue à cette règle.

**Remarques sur « *Colpidium colpoda* »
à propos du travail de PETERS.**

En 1921, PETERS annonçait avoir obtenu la culture pure de *Colpidium colpoda* dans un milieu liquide à base de glycérophosphate d'ammonium. Les résultats de PETERS ont été critiqués par ÆHLER en 1924, qui fait remarquer que PETERS ne s'est pas entouré de garanties suffisantes pour pouvoir affirmer la pureté bactériologique de ses cultures. Les résultats négatifs d'ÆHLER et de E. et M. CHATTON en ce qui concerne la possibilité de culture de *Colpidium colpoda* en milieu liquide, même peptoné, laissaient déjà planer un doute sur l'exactitude des conclusions de PETERS. Cependant l'hypothèse ne pouvait être exclue, étant données les garanties dont s'était entouré PETERS, que cet auteur avait eu à faire à une race physiologique particulière de *Colpidium colpoda*. Cependant en 1928, dans l'article *Protozoa* du *Microtomists Vade Mecum*, PETERS donne de ses expériences, par l'intermédiaire de H. PIXELL-GOODRICH, les explications suivantes :

(1) Il s'agit de flagellés possédant un cytopharynx, c'est-à-dire normalement phagotrophes.

« Au moment où le travail a été effectué (1921 par conséquent), il ne fut pas possible d'isoler de bactéries de la culture d'Infusoires. Deux ans après cependant, il était devenu possible de cultiver des bactéries sur les milieux ordinaires à partir des cultures de *Colpidium* ». Il a été jusqu'à présent impossible à PETERS de libérer les cultures des bactéries.

Il est donc probable que les *Colpidium colpoda* de PETERS n'utilisaient pas le glycérophosphate d'ammonium, mais se nourrissaient des bactéries développées dans le milieu. L'attitude de PETERS évite toute discussion inutile à propos du pouvoir de synthèse de *Colpidium colpoda* que nous considérerons donc, avec ŒHLER et E. et M. CHATTON, comme un phagotrophe obligatoire.

Après avoir étudié les modifications des milieux de culture et le pouvoir de synthèse de *Glaucoma piriformis*, nous émettrons quelques hypothèses sur le pouvoir de synthèse des phagotrophes obligatoires.

Travaux divers sur la culture pure des Ciliés.

En 1930, GLASER et CORIA annoncent avoir obtenu la culture pure de 6 Protozoaires : *Trichoda pura*, *Chilomonas paramaecium*, *Parapolytoma pura*, « un flagellé indéterminé de la famille des *Monadinae* », « un nouveau flagellé » de l'intestin de *Lucilia caesar* également de la famille des *Monadinae*, un grand Cilié indéterminé ». Malgré tout notre désir de voir augmenter le nombre de cultures pures de Protozoaires, il nous est impossible d'accepter sans caution les résultats de GLASER et CORIA. En effet, ces auteurs, est-ce oubli, est-ce négligence, ne nous disent pas s'ils ont pratiqué des épreuves de stérilité et lesquelles, s'ils ont effectué des passages en série ou s'ils se sont contentés d'observer une première culture, et quelle était, au moins approximativement, la densité de leurs cultures. Tous ces détails ont malheureusement leur importance. Les milieux utilisés par GLASER et CORIA sont d'ailleurs assez stupéfiants.

Si nous nous permettons d'ajouter enfin que GLASER et CORIA, ignorant les travaux de leurs prédécesseurs, PRINGSHEIM, MAINX, ŒHLER, les CHATTON, ZOTTA, A. LWOFF, etc..., écrivent en 1930 avec une réelle sincérité : « La protozoologie a été

sérieusement retardée au cours de ces dernières années à cause de l'insuffisance de techniques pour l'obtention de cultures pures », c'est pour mieux déplorer que ces auteurs aient malencontreusement négligé les abondantes ressources bibliographiques dont disposent les Institutions scientifiques américaines.

En 1931, BUTTERFIELD et THERIAUT annoncent avoir obtenu une culture bactériologiquement pure d'un *Colpidium* indéterminé dans un milieu peptoné. Ces auteurs ignorent également tous les travaux qui précèdent le leur. Peut-être ont-ils cultivé *Glaucoma piriformis* ?

Nous noterons enfin que G. MILKOVITCH (1929-1931) a réussi de nouveau la culture pure de *Glaucoma piriformis* en milieu peptoné additionné de sérum. L'addition de sérum est, nous avons eu l'occasion de le dire (1929), une complication parfaitement inutile du milieu de culture.

Etude des modifications chimiques des milieux peptonés pendant le développement d'une culture de « Glaucoma piriformis ».

Les peptones commerciales sont des poudres obtenues par dessiccation de produits d'hydrolyse diastasique, pepsique, trypsique, érepsique, ou chimique, acide chlorhydrique... de protides divers d'origine animale : organes (foie, rate), muscle, fibrine, soie, — ou végétale : graines d'arachide, levure de boulangerie, etc...

Chimiquement, les « peptones vraies » sont des polypeptides complexes, de poids moléculaire élevé, non précipitables par la chaleur, le sulfate d'ammonium, le sulfate de zinc en milieu acide, précipitables par l'acide phosphotungstique et l'alcool et donnant la réaction du biuret. Les peptones commerciales et les autolysats de levure préparés au laboratoire sont des produits très complexes qui renferment en dehors des peptones vraies bien d'autres produits de l'hydrolyse des protides. Lorsque nous parlerons de « peptones » sans autre qualificatif, il s'agira, suivant l'usage établi, des produits commerciaux. Lorsque nous emploierons le mot peptone dans son sens chimique, nous le ferons suivre du qualificatif « vraie », la « peptone vraie » répondant à la définition donnée ci-dessus.

Remarques sur les produits de digestion des protides. —

Nous croyons utile de rappeler ici quelques notions fondamentales sur les produits d'hydrolyse des substances protéiques. Pour plus de détails, nous renvoyons au traité d'EFFRONT (1914) « Les catalyseurs biochimiques ».

La digestion pepsique des protides aboutit à la formation :

a) d'albumoses : albumoses primaires, deutéroalbumoses, précipitables par le sulfate d'ammonium dans certaines conditions et par le sulfate de zinc en milieu acide.

b) Des peptones vraies, ne précipitant pas par le sulfate de zinc en milieu acide, donnant la réaction du biuret, précipitant par l'acide phosphotungstique et par l'alcool.

c) De complexes abiurétiques, non précipitables par l'acide phosphotungstique.

d) D'acides aminés titrables par le formol.

e) D'amides et d'ammoniaque engagé dans des combinaisons décomposables par ébullition avec la magnésie.

La proportion relative de ces corps varie suivant la durée de l'hydrolyse pepsique et, en particulier, les acides aminés et les amides n'apparaissent qu'après une digestion prolongée. Sous l'influence de l'hydrolyse trypsique on voit apparaître les mêmes corps que dans l'hydrolyse pepsique, mais il se forme une plus grande quantité de composés titrables par le formol. Cependant, à la fin de l'hydrolyse trypsique, comme après l'hydrolyse pepsique, on trouve encore des complexes azotés de poids moléculaire élevé, albumoses et peptones vraies, mais une plus grande proportion de ces corps sont digérés dans le travail trypsique. Quant à l'érepsine, qui peut digérer les protoalbumoses, les hétéroalbumoses et les peptones vraies, elle amène surtout au stade acide aminé libre les polypeptides plus ou moins complexes.

La digestion érepsique est régulière, contrairement à la digestion trypsique et surtout à la digestion pepsique au cours de laquelle il se produit des substances qui, de non précipitables, peuvent redevenir précipitables (phénomènes de synthèse).

L'autolyse de la levure paraît due à plusieurs diastases. D'après EFFRONT, « il semble y avoir dans la levure de boulangerie non pas un seul enzyme protéolytique mais plutôt différentes diastases qui concourent ensemble à l'hydrolyse ». L'au-

tolysat de levure renferme, nous le verrons, les mêmes catégories de corps que les peptones résultant de la digestion pepsique ou pancréatique de muscle.

Etude d'un autolysat de levure. — Afin d'essayer de déterminer la nature des composés absorbés par les infusoires et les modifications du milieu de culture nous avons dosé comparativement dans des milieux neufs et dans des milieux ensemencés et étudiés après des temps variables :

a) L'azote précipitable par l'acide phosphotungstique ; il renferme l'azote des albumoses et des peptones vraies ; il est déterminé par différence avec l'azote total après dosage de l'azote non précipité (dosage par la méthode de KJELDAHL).

b) L'azote aminé dosé au formol par la méthode de SÆRENSEN.

c) L'azote amide + ammoniacal dosé après dégagement de NH_3 par ébullition avec MgO .

Soit par exemple un autolysat de levure : nous trouvons pour 1.000 cm^3 .

Azote total.	539 mgr.
Azote précipitable par l'acide phosphotungstique . . .	230 »
Azote non précipitable	309 »
Azote dosable par le formol	206 »
Azote dégagé sous forme de NH_3 par ébullition avec MgO	45 »
Azote X.	58 »

On remarquera que la somme de l'azote aminé et de l'azote amide + ammoniacal ($206 + 45 = 251$) ne représente pas la totalité de l'azote non précipitable par l'acide phosphotungstique : 309. Il y a une différence que nous appelons Azote X et qui, dans le cas particulier est de 58 mgr. On sait que la méthode de SÆRENSEN au formol ne permet pas de doser la totalité de l'azote aminé ; par exemple, avec la proline, on ne dose que 85 pour cent de l'azote qu'elle renferme. D'autre part, l'arginine qui renferme deux fonctions amine joue vis-à-vis du formol le rôle d'une base mono-acide. Mais la majeure partie de l'azote X, l'étude de ses variations au cours de la culture le montrera, nous semble devoir être rapporté à des peptides complexes, non précipitables par l'acide phosphotungstique et non dosables par le formol.

Que se passe-t-il pendant le développement d'une culture d'Infusoires ? En 1926, nous avons, avec NADIA ROUKHELMAN,

publié les principaux résultats de nos dosages. Les chiffres détaillés que nous donnons aujourd'hui sont les chiffres des dosages effectués en collaboration avec Mlle ROUKHELMAN.

Faisons remarquer que, dans les cultures, les ciliés sont tués par le chloroforme et que l'on dose les différents constituants du milieu liquide surnageant après précipitation totale des ciliés. La différence entre l'azote total du liquide surnageant et l'azote total du milieu témoin peut être considérée comme représentant le chiffre d'azote des infusoires. On trouvera dans le tableau ci-dessous le résumé de la marche des variations des différentes formes azotées pendant une culture d'une durée de 40 jours. Toutes les cultures ont été faites dans des vases à toxine de façon à assurer une bonne oxygénation du milieu.

VARIATIONS DES COMPOSÉS AZOTÉS DANS UNE CULTURE
DE *Glaucoma piriformis*

	Témoin	Culture		
		6 jours	10 jours	40 jours
Azote total	539	472	446	490
Azote des Ciliés.	0	67	93	49
Azote précipitable par l'acide phosphotungstique	230	77	40	80
Azote non précipitable par l'acide phosphotungstique	309	395	406	409
Azote dosable par le formol . .	206	210	210	234
Azote amide + ammoniacque. .	45	49	131	174
Azote X	58	136	65	0

Les chiffres sont exprimés en milligrammes d'azote pour 1.000 cm³ de milieu.

Considérons tout d'abord les chiffres du dosage du 6^e jour. Il a été formé 67 mgr. d'« azote infusoires ». L'azote précipitable par l'acide phosphotungstique a diminué de 153 mgr. L'azote amide + ammoniacque et l'azote aminé ont subi des variations insignifiantes (augmentation de 4 mgr.). Au contraire, l'azote X a subi une augmentation de 78 mgr. On peut interpréter ainsi ces chiffres : la nutrition des Glaucomes dans cette première phase de la culture s'est faite aux dépens des substances précipitables par l'acide phosphotungstique, appelons-les polypeptides complexes pour simplifier, puisqu'aussi bien il y a, entre les albumoses et les peptones vraies, tous les intermédiaires.

Mais le chiffre de la diminution de l'azote « polypeptides » est supérieur au chiffre de l'azote infusoire formé. Par contre, l'azote X a subi une forte augmentation. L'azote aminé n'ayant pas changé, il est logique d'interpréter ces faits de la manière suivante : les polypeptides complexes, albumoses + peptones vraies, ont été directement utilisés par les Glaucomes et ont été transformés en partie, par les diastases excrétées, en polypeptides plus simples, non précipitables par l'acide phosphotungstique et non dosables par le formol (azote X).

Du 6^e au 10^e jour, l'azote infusoire a augmenté de 34 mgr. L'azote polypeptide complexe a diminué de 37 mgr. L'azote X a diminué de 71 mgr. ; l'azote aminé est resté inchangé et l'azote amide + ammoniacque a augmenté de 82 mgr.

Au 40^e jour le chiffre de l'azote ammoniacal atteindra 174 mgr. A ce moment, il y a dans la culture beaucoup de cadavres en autolyse. Le chiffre de l'azote infusoire est passé de 93 mgr. (10^e jour) à 49 mgr. et on peut attribuer l'augmentation des acides aminés constatée à des produits d'autolyse des ciliés. Fait remarquable, l'azote X a complètement disparu et l'azote non précipitable par l'acide phosphotungstique est représenté en totalité par la somme de l'azote formol et de l'azote amide + ammoniacque.

Dans cette culture, il ne semble donc pas y avoir eu absorption des acides aminés par les Glaucomes, à moins d'admettre l'existence d'une absorption qui a été par hasard exactement compensée par la production d'acides aminés aux dépens des polypeptides, sous l'influence des diastases protéolytiques. Dans une autre série de dosages qui ont porté sur une culture dans

un autolysat de levure plus poussé (rapport $\frac{\text{azote phosphotungstique}}{\text{azote total}}$ moins élevé), nous avons en effet pu constater qu'il y avait diminution régulière du chiffre des acides aminés. Si nous considérons le tableau ci-dessous (tableau 2), nous voyons qu'au 10^e jour, il y a eu diminution de 67 mgr. d'azote aminé. L'azote ammoniacal n'a augmenté que de 21 mgr. On peut évidemment se demander si une partie de l'azote aminé n'est pas entrée dans la constitution de l'azote X qui a considérablement augmenté. Mais il nous paraît plus simple de supposer que, comme dans l'expérience précédente, l'azote X est produit aux dépens des polypeptides complexes, albumoses et peptones vraies, et que la nutrition des Glaucomes s'est effectuée aux dépens des albumoses, des peptones vraies, des acides aminés et aussi de l'azote X qui doit être en partie utilisé pendant sa formation.

VARIATIONS DES COMPOSÉS AZOTÉS DANS UNE CULTURE
DE *Glaucoma piriformis*

	Témoin	Culture		
		10 jours	17 jours	20 jours
Azote total.	700	560	542	535
Azote des Ciliés	0	140	158	165
Azote précipitable par l'acide phosphotungstique	257	115		49
Azote non précipitable	443	445		486
Azote formol.	277	210	196	234
Azote amide + ammoniaque.	84	105	154	199
Azote X	82	130		53

Les chiffres sont exprimés en milligrammes d'azote pour 1.000 cm³ de milieu.

En dehors de ces dosages, nous avons pu constater :

1° Que la réaction de l'urée au xanthidrol est toujours négative quel que soit l'âge de la culture.

2° Que l'urée introduite dans le milieu de culture se retrouve quantitativement après développement des ciliés.

3° Que la réaction des bases puriques (NO_3Ag en milieu ammoniacal), négative dans le milieu témoin, donne un abondant précipité blanc jaunâtre dans une culture âgée (95 jours).

4° Que les réactions de l'acide urique sont négatives.

Nous pouvons tirer de ces expériences les conclusions suivantes :

Dans les milieux peptonés où se développe une culture de *Glaucoma piriformis*, il y a diminution rapide et importante des corps azotés précipitables par l'acide phosphotungstique, albumoses et peptones.

C'est en grande partie aux dépens de ces corps que les ciliés effectuent la synthèse de leurs constituants protidiques.

Il y a augmentation rapide, puis diminution et même disparition de l'azote X qui représente probablement des peptides complexes, non précipitables par l'acide phosphotungstique, et non titrables par le formol. Il est probable que les Glaucomes absorbent et utilisent ces peptides.

Dans les cultures âgées anciennes, il y a augmentation des acides aminés, due selon toute vraisemblance à l'autolyse des ciliés. Dans les cultures jeunes, le chiffre des acides aminés peut rester constant ou diminuer. Dans ce dernier cas, il est probablement peu douteux que les acides aminés sont absorbés par les Glaucomes.

Il y a, dans les cultures, augmentation de l'azote amide + ammoniacque ; toutefois, dans les premiers jours du développement de la culture où il y a cependant multiplication abondante des infusoires, le chiffre de l'azote amide + ammoniacque n'augmente que d'une manière insignifiante.

Les ciliés ne produisent pas d'urée et l'urée introduite dans les milieux de culture n'est pas transformée.

Fermentation des glucides par Glaucoma piriformis. — On connaît l'influence favorisante de certains glucides sur la multiplication des Flagellés parasites. Le glucose entre dans la constitution de nombreux milieux de cultures pour les Trypanosomi-

des. Il pouvait être intéressant de connaître le pouvoir fermentatif des Protozoaires libres. Avec J. COLAS-BELCOUR, nous avons en 1925 fait connaître les résultats que nous avons obtenus sur *Glaucoma piriformis*.

Le milieu peptoné utilisé pour le Glaucome est additionné des glucides à expérimenter etensemencé. Le pH initial est 7,2. Dans les tubes où le glucide a été attaqué, le pH, au 15^e jour, est voisin de 5,2; si le glucide n'a pas été attaqué, le pH est voisin de 7,8-8,00. Nous donnons ci-dessous la liste des glucides étudiés. Le signe + indique l'acidification du milieu (l'attaque), le signe — indique une réaction alcaline.

Mannite	—
Arabinose	—
Xylose	—
Lévulose	+
Glucose	+
Galactose	+
Maltose	+
Saccharose	—
Lactose	—
Inuline	—
Amidon	—

Seuls sont donc attaqués, lévulose, glucose, galactose, maltose.

Des expériences comparatives ont été faites avec des Trypanosomides : *Leptomonas ctenocephali* (souche CHATTON) et *Leishmania tropica* et *infantum*. Ces trois Flagellés ont attaqué uniquement le glucose et le lévulose. L'année suivante (1926), NOGUCHI et TILDEN, sans d'ailleurs connaître notre travail, étudiaient systématiquement la fermentation des glucides par de nombreux Trypanosomides. Il résulte de leurs recherches que les Trypanosomides du genre *Strigomonas* (*Leptomonas*), *S. oncopelti* par exemple, fermentent un grand nombre de glucides : glucose, lévulose, mannose, saccharose, raffinose, inuline, galactose, maltose, salicine, xylose, mannite, arabinose. Il y a cependant des différences spécifiques : c'est ainsi que *Leptomonas culicidarum* est le seul à fermenter l'amygdaline.

Les *Leishmania* attaquent glucose, lévulose, mannose, saccharose, raffinose.

Leptomonas ctenocephali et *Trypanosoma rotatorium* n'attaquent aucun glucide.

Sauf en ce qui concerne l'attaque du lévulose et du glucose par les Leishmanies, nos résultats sont donc en désaccord avec ceux de NOGUCHI et TILDEN. Nous nous abstiendrons donc de faire un tableau comparatif des glucides fermentés par *Glaucoma piriformis* et les divers Trypanosomides jusqu'à ce que de nouvelles recherches viennent expliquer les divergences de nos résultats et de ceux de NOGUCHI et TILDEN. Notons simplement l'intérêt qu'il y aurait à posséder, pour chaque espèce isolée en culture pure, la liste des glucides utilisables.

Essais d'anaérobiose.

Glaucoma piriformis est aérobie et ne se multiplie pas dans les milieux peptonés privés d'oxygène.

Des milieux peptonés sontensemencés avec une culture de *Glaucoma piriformis*. On fait le vide à la trompe et le milieu est débarrassé de l'air qu'il contient par ébullition. Le tube est ensuite scellé. On constate alors qu'il n'y a aucun développement des ciliés. Dans des tubes additionnés préalablement de glucose, on peut trouver trois jours après l'ensemencement des ciliés mobiles. Mais il ne s'y produit aucune multiplication ; dans les tubes de milieu peptoné sans glucose, tous les Glaucomes sont morts.

Cette brève constatation confirme les conclusions du mémoire de FAURÉ-FRÉMIET, C. LÉON, A. MAYER et L. PLANTEFOL (1929), à savoir que le mouvement ciliaire des Paramécies peut se produire dans des milieux privés d'oxygène.

Nous voyons en plus que la présence de glucose dans les milieux permet une activité ciliaire prolongée et on est en droit de se demander si les glucides ne jouent pas un rôle important dans l'énergétique du mouvement ciliaire. Dans les expériences de FAURÉ-FRÉMIET, C. LÉON, A. MAYER et L. PLANTEFOL, le glucide a pu être fourni par les réserves de glycogène que l'on sait exister chez les Paramécies.

Glaucoma piriformis est donc un aérobie strict.

Le pouvoir de synthèse de « Glaucoma piriformis »

Nous avons vu que *Glaucoma piriformis* peut effectuer sa croissance et se multiplier indéfiniment dans des solutions de peptones provenant de l'hydrolyse pepsique ou pancréatique du muscle. Le muscle est un protide complet. Tous les acides aminés constitutifs de la matière vivante qui y ont été recherchés y ont été trouvés. Le muscle renferme en particulier les acides aminés indispensables : lysine, tryptophane, cystine... sans lequel le maintien de l'équilibre azoté des Vertébrés est impossible. Nous nous sommes proposé de rechercher si ces acides aminés indispensables le sont également pour *Glaucoma piriformis*.

GLAUCOMA PIRIFORMIS

Nutrition azotée.

Nitrates	o
Sels d'ammonium	o
Acides animés isolés	o
Mélanges d'acides aminés	o
Soie hydrolysée	o
Ereptone	o
Peptone de muscle très hydrolysée	+
P. pancréatique de muscle (début de digestion).	++
P. pepsique de muscle	++
P. pepsique d'arachide	++

Dans une première série d'essais, nous avons tenté de fournir au Glaucome l'azote, soit sous forme de sels d'ammonium, glycérophosphate, lactate, acétate, soit sous forme d'acides aminés ou d'amides : glycocolle, asparagine, glucosamine, cystéine. Il ne se produit aucune culture dans les milieux où l'azote est représenté sous ces diverses formes et où se trouvent également des sels minéraux.

Le milieu employé avait une constitution voisine de celui dont la formule a été donnée (voir p. 45).

Glaucoma piriformis ne peut donc utiliser les corps azotés simples, suffisants pour *Polytoma uwelli*.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons fourni à *Glaucoma* des protides incomplets, c'est-à-dire auxquels manquent certains acides aminés : soie-gélatine.

La gélatine a été utilisée en solution et la soie sous forme de peptone de soie (HOFFMANN-LA ROCHE), qui est de la sérine hydrolysée par la chaux. Tous les résultats sont négatifs. Les milieux à la gélatine, à la soie, additionnés dans les proportions voulues des acides aminés qui leur font défaut, additionnés aussi de lécithine du jaune de l'œuf de poule, n'ont en aucun cas permis le développement des Glaucomes.

Nous avons essayé alors l'éreptone qui est le produit d'hydrolyse pepsique, puis trypsique, puis éreptique, du muscle de bœuf. Comme précédemment, résultats entièrement négatifs.

Dans tous ces essais, on a systématiquement négligé le résultat du premier repiquage qui a montré le plus souvent une légère multiplication des ciliés, ce qui prouve tout au moins que les milieux n'étaient pas toxiques. Le plus souvent, le deuxième et en tous cas le troisième repiquages étaient impossibles.

Il est très difficile de tirer une conclusion de ces expériences toutes négatives. Des essais avec l'éreptone, on pourrait conclure que *Glaucoma piriformis* ne peut utiliser les acides aminés libres, ou tout au moins que certains d'entre eux doivent être combinés et à l'état de di-, de tri- ou de polypeptides plus ou moins complexes. Mais ce n'est là qu'une hypothèse de travail.

Remarquons que nous nous plaçons dans des conditions expérimentales différentes et, on peut dire plus sévères, que celles adoptées généralement par les physiologistes qui ont travaillé sur les Vertébrés. Il ne peut s'agir pour nous de maintenir un animal en équilibre azoté pendant quelques jours, ou d'observer la courbe du poids pendant une période relativement courte de sa vie. Nous avons tenté d'établir un milieu permettant la multiplication *indéfinie* du Glaucome et remarquons-le bien, en l'absence de toute bactérie ou de tout produit d'origine bactérienne.

Nous n'y avons pas réussi. Le problème est d'ailleurs fort compliqué à résoudre et nécessiterait la collaboration de plusieurs chimistes.

Nous croyons cependant que les besoins azotés des Protistes hétérotrophes vrais, du type physiologique *Glaucoma piriformis*,

doivent se rapprocher beaucoup de ceux des Mammifères et qu'en particulier, les acides aminés indispensables pour les Mammifères le sont également pour le Glaucome. Peut-être aussi certains peptides sont-ils indispensables. Mais répétons-le ce ne sont là que des hypothèses. Remarquons ici que, du point de vue de leur nutrition azotée, les Trypanosomides *Leptomonas ctenocephali* et *Strigomonas (Leptomonas) fasciculata* et *oncopelti* se comportent comme *Glaucoma piriformis* (M. LWOFF 1928-1929-1930-1931). C'est aussi le cas d'*Euglena gracilis* après deux ans de culture à l'obscurité (A. LWOFF et H. DUSI, 1931), faits sur lesquels nous reviendrons dans les chapitres suivants.

CHAPITRE III

CHLAMYDOMONAS AGLOEFORMIS ET HÆMATOCOCCUS PLUVIALIS

Historique

Nous abordons dans ce chapitre la question du pouvoir de synthèse à l'obscurité des organismes autotrophes.

Le problème que nous nous sommes posé est le suivant : étant donné un Flagellé autotrophe, *Chlamydomonas*, *Hæmatococcus*, *Euglena*, quels seront ses besoins azotés et carbonés si on supprime la fonction chlorophyllienne en maintenant les cultures à l'obscurité?

Toutes nos recherches sur ce sujet ont été effectuées avec des souches provenant des collections du Pflanzenphysiologisches Institut de l'Université allemande de Prague. Ces souches ont été isolées soit par le professeur E. G. PRINGSHEIM, soit par le docteur F. MAINX, qui nous ont très libéralement envoyé les cultures que nous leur avons demandées. Qu'ils trouvent une fois de plus ici nos remerciements. Notre étude a été commencée en collaboration avec MARGUERITE LWOFF et a fait l'objet d'une note préliminaire (1929) dans laquelle a été exposé l'essentiel de nos résultats. Nous donnerons ici en détail les expériences réalisées et les techniques suivies, ainsi que les résultats nouveaux obtenus.

Matériel. — Nous avons utilisé *Chlamydomonas agloëformis* PASCHER et *Hæmatococcus pluvialis* FLOTOW dont les cultures bactériologiquement pures ont été réalisées par F. MAINX.

Pouvoir de synthèse à la lumière

Chlamydomonas agloëformis et *Hæmatococcus pluvialis* possèdent de la chlorophylle et sont autotrophes à la lumière, c'est-à-dire qu'ils peuvent se multiplier indéfiniment dans des milieux où l'azote est fourni sous forme de sels minéraux. C'est ainsi que, à la lumière, ces deux Flagellés donnent de très belles cultures dans le milieu suivant :

Chlorure de potassium	0,2
Sulfate de magnésium	0,2
Phosphate acide de sodium	0,2
Perchlorure de fer	0,005
Eau distillée	1.000

additionné de sulfate ou de phosphate d'ammonium (pH = 7,0).

Les nitrates sont moins favorables, surtout pour *Hæmatococcus* ; mais *Chlamydomonas* assimile parfaitement les nitrates de potassium et de calcium.

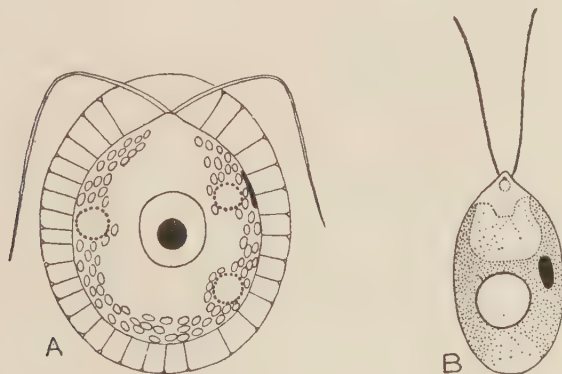


FIG. 3.

A) *Hæmatococcus pluvialis*, d'après REICHENOW, 1909.

B) *Chlamydomonas agloëformis*, d'après PASCHER, 1927.

Pouvoir de synthèse à l'obscurité.

Pour ces expériences, nous avons utilisé le milieu de DETMER dans laquelle la source azotée minérale est remplacée par divers composés azotés organiques et auquel est ajoutée aussi une source carbonée organique.

a) *Milieu d'entretien*. — Après une série de tâtonnements, nous nous sommes arrêté aux deux milieux suivants :

1°	Chlorure de potassium	0,2
	Sulfate de magnésium	0,2
	Phosphate acide de sodium	0,2
	Acétate de sodium	2
	Asparagine	2
	Perchlorure de fer.	0,005
	Eau bidistillée	1.000
	Soude : q. s. pour pH = 7,00	

2° Le même milieu, pour tous ses constituants sauf l'asparagine, qui est remplacée par la peptone pancréatique du muscle (2 pour 1.000).

Les premiers essais de culture à l'obscurité se sont montrés d'emblée favorables (M. et A. LWOFF, 1929). Pour *Chlamydomonas agloëformis*, les cultures commencées en janvier 1929 sont toujours en très bon état, janvier 1932. Pour *Hæmatococcus pluvialis*, les cultures ont été maintenues à l'obscurité pendant près de deux ans, de janvier 1929 à décembre 1930. Mais la souche entretenue à l'obscurité ayant été contaminée par une bactérie, une nouvelle série a été recommencée en janvier 1931 qui est actuellement, janvier 1932, en parfait état.

Épreuves de pureté bactériologique. — Ces cultures ont été soumises aux mêmes épreuves de pureté que *Polytoma uvella* (voir p. 15). Elles sont donc bactériologiquement pures comme l'annoncent PRINGSHEIM et MAINX (1926).

**Les sources azotées pour « *Chlamydomonas agloëformis* »
et « *Hæmatococcus pluvialis* »**

Nos premières tentatives de culture à l'obscurité ont été faites dans le milieu n° 2 (voir page précédente). Dans une première

série d'expériences, nous avons essayé la valeur nutritive de diverses peptones. Nous pouvons dire que toutes les peptones favorables au développement de *Glaucoma piriformis* permettent un très bon développement de *Chlamydomonas* et d'*Hæmatococcus*. Pour chaque peptone, il a été effectué au moins trois repiquages successifs.

Dans ces conditions, nous avons constaté que les peptones résultant de la digestion pancréatique peu poussée, ou très poussée, du muscle de bœuf, celles résultant de la digestion pepsique peu ou très poussée du même protide, donnaient les mêmes excellents résultats (M. et A. LWOFF 1929). Les *Chlamydomonas* forment en 8 à 15 jours suivant l'ensemencement, un voile épais ou un anneau sous la surface libre du milieu. Les *Hæmatococcus*, au début des cultures tout au moins, se développent d'une façon homogène dans le milieu. Ce n'est que vers la fin du développement qu'ils forment un anneau à la partie supérieure de la colonne liquide. Les repiquages des cultures sont faits toutes les trois semaines. Il faut noter toutefois que la culture de *Chlamydomonas* se maintient beaucoup plus longtemps, jusqu'à deux mois, dans les milieux peptonés, que celle d'*Hæmatococcus*.

Acides aminés. — Dans une autre série d'expériences, nous avons étudié la valeur nutritive de divers acides aminés. Les premiers essais ont eu lieu dans le milieu n° 1 (voir p. 76) à l'acétate de sodium où la source azotée est représentée par l'asparagine.

Chlamydomonas et *Hæmatococcus* se multiplient dans le milieu aussi bien que dans les milieux peptonés. Les Flagellés ont été entretenus pendant deux ans (un repiquage toutes les trois semaines) dans ce milieu à l'asparagine.

L'asparagine peut être remplacée par des acides aminés comme le glycolle. Pendant un an les deux Flagellés ont été entretenus dans un milieu du type 1 (p. 76) au glycolle; au bout d'une année de cultures positives, nous avons interrompu l'entretien en glycolle. Les cultures sont toutefois moins abondantes qu'en asparagine. La cystéine, sous forme de chlorhydrate de cystéine, a permis l'entretien de *Chlamydomonas agloëformis* (6 repiquages). Les cultures sont abondantes; mais la cystéine constitue une moins bonne source azotée que le glycolle.

CHLAMYDOMONAS AGLOËFORMIS et HÆMATOCOCCUS PLUVIALIS

Nutrition azotée et nutrition carbonée.

		Nitrates	Sels d'ammonium	Asparagine	Asparagine + acétate de Na	Glycocolle	Glycocolle + acétate de Na	Cystéine + acétate de Na	Peptone	Peptone + acétate de Na
Lumière	<i>Chlamydomonas agloëformis</i>	++	++	++	++	++	++		++	++
	<i>Hæmatococcus pluvialis</i>	++	++	++	++	++	++		++	++
Obscurité	<i>Chlamydomonas agloëformis</i>	o	o	+	++	+	++	+	+	++
	<i>Hæmatococcus pluvialis</i>	o	o	+	++	+	++	o	+	++

La cystéine ne permet pas la culture d'*Hæmatococcus pluvialis*.

Tous nos essais de culture à l'obscurité de *Chlamydomonas* et d'*Hæmatococcus* dans le milieu à l'acétate de sodium où la source azotée est représentée par un sel d'ammonium sont restés négatifs.

Au point de vue de leur nutrition azotée, *Chlamydomonas agloëformis* et *Hæmatococcus pluvialis* se rapprochent donc beaucoup de *Polytoma uvella*. Comme *Polytoma*, ils peuvent se nourrir de polypeptides complexes, mais possèdent aussi le pouvoir de faire la synthèse de tous leurs protides à partir d'un seul acide aminé, ce qui revient à faire la synthèse de tous leurs acides aminés à partir d'un groupement NH_3 . Mais contrairement à *Polytoma uvella*, tout au moins à la majorité des souches de *Polytoma uvella*, *Chlamydomonas* et *Hæmatococcus* ne peuvent se développer à l'obscurité en présence de sels d'ammonium.

Les sources carbonées organiques.

Nous nous sommes demandé si, comme pour *Polytoma uvella*, une source carbonée indépendante, ici l'acide acétique, est indispensable. Dans le milieu n° 1 (à base d'asparagine) ou n° 2 (à base de peptone), nous avons donc supprimé l'acétate de sodium.

La suppression de l'acide acétique exerce une action manifeste sur le développement des cultures qui est plus lent. Mais si les cultures sont moins riches dans les milieux sans acétate que dans les milieux avec acétate, elles sont néanmoins repiquables en série. Dans le milieu à l'asparagine en particulier — sans acétate — quatre repiquages ont été effectués avec *Hæmatococcus*, dix avec *Chlamydomonas*. Il faut noter que, dans ces conditions, les cultures de *Chlamydomonas* renferment de tout petits flagellés et très peu, ou pas du tout, de formes hypertrophiques à division palintomique.

Contrairement à *Polytoma uvella*, *Chlamydomonas* et *Hæmatococcus* peuvent donc se passer d'une source carbonée organique indépendante. Cette propriété qui sera discutée plus loin (voir p. 120) est pour nous en relation avec la persistance de la chlorophylle à l'obscurité.

Les acides organiques utilisables. — Nous avons vu que l'addition d'acide acétique, sous forme de sel de sodium, au milieu à l'asparagine, permet un développement abondant des cultures. Nous avons donc étudié comparativement le développement induit par l'addition de divers acides. Dans tous ces essais, les milieux à l'asparagine et à l'asparagine + acétate de sodium servaient de témoins. Ont été essayés les acides butyrique, succinique, tartrique, lactique, glycérphosphorique, malique et citrique. Seul, l'acide butyrique a provoqué une augmentation de développement. Sa valeur alimentaire est toutefois moins grande que celle de l'acide acétique. Quant aux milieux à l'asparagine additionnés des acides succinique, tartrique, lactique, glycérphosphorique, malique et citrique, ils ont permis le même développement que les milieux témoins à l'asparagine seule.

Il en résulte que *Chlamydomonas aglaëformis* et *Haematococcus pluvialis* comme *Polytoma uvella* n'assimilent que les acides

gras inférieurs, acide acétique et butyrique, à l'exclusion des acides appartenant à d'autres séries. Nous avons vu que ces acides gras inférieurs ne sont pas indispensables, mais améliorent cependant beaucoup le développement des cultures, faits qui seront discutés dans la deuxième partie du travail.

Synthèse de la chlorophylle à l'obscurité.

Après trois et deux années de culture à l'obscurité, *Chlamydomonas* et *Hæmatococcus* possèdent toujours de la chlorophylle dans leurs plastes. Cette chlorophylle est moins abondante que chez les mêmes organismes cultivés à la lumière, mais la teinte générale des cultures examinées à l'œil nu est le vert franc, ceci aussi bien dans le milieu à la peptone + acide acétique que dans celui à l'asparagine + acide acétique. La teinte des cultures entretenues en milieu au glyocolle + acide acétique est beaucoup plus pâle, elle tire légèrement sur le jaune. Et l'examen microscopique confirme que les flagellés contiennent moins de chlorophylle que ceux cultivés en asparagine ou en peptone. Nous avons eu un moment l'espoir de supprimer complètement la chlorophylle par culture prolongée en milieu au glyocolle + acétate de sodium, mais la teneur en chlorophylle qui diminue rapidement au début de la mise à l'obscurité, se stabilise par la suite et après 8 mois de culture en milieu au glyocolle, les flagellés renferment toujours une petite quantité de chlorophylle.

Chlamydomonas et *Hæmatococcus* font donc la synthèse de leur chlorophylle à l'obscurité.

Cette synthèse n'a été observée qu'exceptionnellement chez les végétaux supérieurs : Cryptogames vasculaires, Phanérogames (Angiospermes et Gymnospermes). Mais nous savons au contraire qu'elle est presque de règle chez les Algues inférieures, *Nostoc* (BOUILHAC, 1898), gonidies de Lichens, *Chroococcum*, *Xanthorica* (ARTARI, 1899), *Chlorella vulgaris* (RADAIS, 1900), *Stichococcus bacillaris* (MATRUCHOT et MOLLIARD, 1902), *Cystococcus humicola* (CHARPENTIER, 1903), etc. Nous joignons à ces exemples ceux de *Chlamydomonas agloëformis* et d'*Haematococcus pluvialis* (M. et A. LWOFF, 1929).

Mais nous faisons remarquer dès maintenant que cette propriété n'est pas une propriété générale des Flagellés verts et qu'en particulier, parmi les Euglénien, *Euglena gracilis* perd très rapidement sa chlorophylle à l'obscurité. Remarquons également qu'il existe des Chlamydomonadines incolores — les *Polytoma* par exemple — qui, quoique possédant un leucoplaste très développé, ont cependant perdu la propriété de faire la synthèse de la chlorophylle. Tous ces faits seront rappelés et confrontés dans un chapitre spécial.

Remarques sur la synthèse de la carotine.

Nous rappelons simplement ici qu'*Hæmatococcus pluvialis* peut, dans certaines conditions, se charger d'un pigment rouge carotinoïde. A l'obscurité, seul le stigma renferme du pigment rouge. Les formes flagellées ne montrent qu'exceptionnellement et seulement dans les très vieilles cultures quelques granules de carotine. Les formes palmelloïdes peuvent cependant faire la synthèse du carotinoïde en l'absence de lumière.

A la lumière, la synthèse massive du carotinoïde est déterminée d'une manière spécifique par l'acide acétique fourni sous forme de sel de sodium (M. et A. LWOFF, 1929). Cette question très spéciale fera l'objet d'un travail séparé.

CHAPITRE IV

EUGLENA GRACILIS

(*Flagellé Euglénidé*)

Historique.

En 1900, ZUMSTEIN montre qu'*Euglena gracilis* peut se multiplier à l'obscurité en milieu peptoné, ce que confirment TERNETZ (1912), PRINGSHEIM (1912), MAINX (1928). Mais ces auteurs n'ont pas poursuivi leurs expériences assez longtemps pour obtenir une race « physiologiquement stable » d'*Euglena gracilis*. Nous verrons en effet que cette stabilité physiologique n'est réalisée qu'après plusieurs mois de vie à l'obscurité et c'est seulement lorsqu'elle est établie, que l'on peut étudier le pouvoir de synthèse.

La souche d'*Euglena gracilis* qui a servi pour nos expériences provient des collections du Pflanzenphysiologisches Institut de l'Université allemande de Prague. Nous la devons comme les souches de *Chlamydomonas agloëformis* et d'*Hæmatococcus pluvisialis* à l'obligeance du professeur PRINGSHEIM et du docteur MAINX. La culture qui nous a été envoyée était bactériologiquement pure ; nous l'avons vérifié en la soumettant aux épreuves habituelles (voir p. 15).

Il s'agissait pour nous de déterminer, comme pour les deux Chlamydomonadinés étudiés dans le précédent chapitre, le pouvoir de synthèse d'*Euglena gracilis* à l'obscurité. Toutes les expériences ont été faites en collaboration avec Hisatake DURI et ont fait l'objet de deux notes préliminaires où a été consigné l'essentiel des résultats expérimentaux et des conclusions. Nous développons ici simplement le détail des expériences qui ont été présentées d'une manière très condensée.

Le pouvoir de synthèse à la lumière.

Euglena gracilis est autotrophe à la lumière ainsi que l'a montré ZUMSTEIN (1900) qui a réussi à obtenir des cultures dans le milieu de Knop :

Nitrate de calcium	1
Nitrate de potassium	0,25
Phosphate monopotassique	0,25
Sulfate de magnésium	0,25
Phosphate de fer	traces
Eau	1.000

Les cultures dans ce milieu étaient fort pauvres et ZUMSTEIN avait prévu que l'on pourrait obtenir des résultats meilleurs en remplaçant les nitrates par des sels d'ammonium. Cette prévision fut vérifiée par TERNETZ en 1912. PRINGSHEIM, en 1913, montrait l'importance de la réaction du milieu et obtenait également de bonnes cultures en milieux minéraux, résultats qui ont été confirmés par MAINX (1928).

Hisatake DURI (19) a fait remarquer que tous ces auteurs n'ont effectué qu'un seul ensemencement dans le milieu à étudier. L'expérience ayant montré à DURI que le premier repiquage peut être positif et les repiquages ultérieurs impossibles, il a entrepris des recherches systématiques qui ont abouti aux résultats suivants. Le nitrate de calcium ne permet pas l'entretien des cultures d'*Euglena gracilis* à la lumière : première culture pauvre ; deuxième et troisième, très pauvres ; quatrième, nulle. Les nitrates de potassium et de sodium permettent des cultures pauvres mais indéfiniment repiquables. Le nitrate d'ammonium fournit de bonnes cultures, les sulfate et phosphate d'ammonium de très bonnes cultures, indéfiniment repiquables.

Euglena gracilis est donc parfaitement autotrophe. La conclusion de DANGEARD (1902) que *Euglena gracilis* est « plutôt

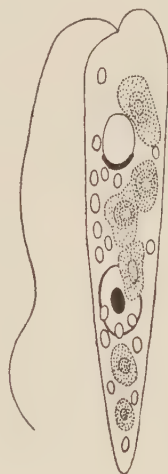


FIG. 4.—*Euglena gracilis*
d'après ZUMSTEIN,
1899.

hétérotrophe » tient à ce que cet auteur, expérimentant d'ailleurs avec des cultures impures, n'a essayé comme seule source azotée que le nitrate de calcium qui est précisément inutilisable. Remarquons en passant qu'il est difficile à un organisme d'être « plutôt hétérotrophe ». Beaucoup d'organismes autotrophes sont capables de nutrition hétérotrophe mais ils n'en sont pas moins autotrophes, à condition bien entendu qu'on leur fournisse les corps minéraux qu'ils sont capables d'utiliser.

Pouvoir de synthèse à l'obscurité.

Nous basant sur les conclusions de ZUMSTEIN, nous nous attendions à obtenir d'emblée, à l'obscurité, dans les milieux peptonés de belles cultures d'*Euglena gracilis*. Nos premiers essais furent décevants. Dans un milieu où la source azotée était représentée par du muscle de bœuf ayant subi une digestion pancréatique très poussée, nous n'obtenions que des cultures très pauvres.

Nous avons alors pensé qu'une source carbonée indépendante pouvait être indispensable et nous avons constitué le milieu suivant :

Sulfate de magnésium.	0,25
Phosphate acide de potassium	0,25
Chlorure de potassium	0,25
Perchlorure de fer.	0,0025
Acétate de sodium.	2
Peptone de muscle de bœuf (très hydrolysée)	2
Eau bidistillée	1.000
NaOH, q. s. pour pH = 7,00.	

À l'obscurité, *Euglena gracilis* se multiplie abondamment dans ce milieu. Une souche y a donc été régulièrement entretenue. Au bout de quelques mois toutefois, la peptone très hydrolysée a été remplacée par une autre peptone résultant du début de digestion pancréatique du muscle. À cette modification près, c'est donc dans ce milieu qu'*Euglena gracilis* est entretenue depuis trois ans : janvier 1929 à janvier 1932. Les repiquages sont faits tous les mois. Les tubes, renfermant de 10 à 12 cm³ de

milieu, ensemencés avec 1 goutte d'une culture, montrent à la fin de la troisième semaine une culture dense ne présentant que des formes flagellées, jusqu'à 250 par mm³. Les formes flagellées se maintiennent pendant deux mois environ, puis apparaissent les formes palmelloïdes, lesquelles, au début, présentent des formes de division. Dans les cultures très anciennes, les seuls éléments vivants sont les palmelles disposées en anneau sur le verre, juste au-dessous de la surface du liquide.

Nous avons été obligé pour la clarté de l'exposé de diviser en deux parties les résultats relatifs au pouvoir de synthèse, les résultats obtenus pendant les 10 premiers mois et ceux obtenus après 30 mois de culture à l'obscurité différant sensiblement. Nous exposons d'abord les résultats obtenus pendant les premiers mois de culture à l'obscurité.

Comme dans les expériences sur *Polytoma uvela*, le milieu de base est constitué par la partie minérale du milieu de DETMER. Rappelons-le ici :

Sulfate de magnésium.	0,25
Phosphate acide de sodium	0,25
Chlorure de potassium	0,25
Perchlorure de fer.	0,0025
Eau bidistillée	1.000

Ce milieu est additionné de divers corps azotés et carbonés et ajusté à pH = 7,00 par addition de soude.

Milieu minéral + asparagine = pas de culture du tout.

Milieu minéral + asparagine + acétate de sodium = 1^{er}, 2^e et 3^e repiquages, cultures lentes et pauvres. Il se forme à la surface du milieu un voile de formes palmelloïdes. Il n'y a pas, ou il y a de très rares flagellés. Au 4^e repiquage, pas de culture.

Milieu minéral + soie hydrolysée = culture lente et pauvre, cependant repiquable en série.

Milieu minéral + soie hydrolysée + acétate de sodium = très bonnes cultures ; une souche a été entretenue dans ce milieu du 29 mai au 9 novembre 1929, soit un peu plus de cinq mois, temps pendant lequel il a été effectué 7 repiquages : 1^{er} et 29 mai, 2 et 25 juin, 17 juillet, 15 août, 10 septembre, 10 octobre, 9 novembre.

Milieu minéral + muscle hydrolysé (digestion pancréatique très poussée) = cultures lentes et pauvres, repiquables en série.

Milieu minéral + muscle hydrolysé (digestion pancréatique très poussée + acétate de sodium = très bonnes cultures.

Milieu minéral + muscle hydrolysé (digestion pepsique, début) = bonnes cultures : 9 repiquages ont été effectués du 26 avril au 9 novembre : 26 avril, 5 mai, 4 juillet, 17 juillet, 15 août, 10 septembre, 10 octobre, 9 novembre.

Milieu minéral + muscle hydrolysé (digestion pepsique, début) + acétate de sodium = cultures très riches.

A la lumière, tous ces milieux, avec ou sans acétate de sodium, permettent naturellement des cultures très riches. Nous avons toujours essayé à la lumière les milieux donnant des résultats négatifs à l'obscurité, afin de vérifier que l'absence de développement n'est pas due à la toxicité du milieu.

Il résulte de ces expériences que, seul, le muscle peu dégradé, (digestion pepsique peu poussée), riche en polypeptides, a permis la culture à l'obscurité sans source carbonée indépendante. Cependant l'addition d'acétate de sodium améliore toujours sensiblement le rendement des cultures. Les produits d'hydrolyse plus poussée des protides, muscle ayant subi une digestion pancréatique prolongée, sérine de la soie hydrolysée par la chaux, ne permettent à eux seuls qu'une multiplication très lente. L'adjonction d'acétate de sodium aux milieux renfermant ces « peptones » permet des cultures très riches.

Essais d'obtention d'un milieu synthétique. — Le fait d'avoir obtenu trois repiquages successifs en milieu à l'asparagine + acétate de sodium, le fait aussi d'avoir obtenu de fort belles cultures en milieu à la soie hydrolysée + acétate de sodium, nous a porté à supposer qu'il suffirait d'ajouter quelques composés simples au milieu à l'asparagine + acétate de sodium, pour y permettre le développement indéfini des cultures d'*Euglena gracilis* à l'obscurité.

Nous avons alors ajouté au milieu minéral + asparagine + acétate de sodium, des acides aminés ou des mélanges d'acides aminés à une concentration de 0,1 0/0. Le changement de pH est négligeable pour *Euglena gracilis* qui se multiplie parfaitement dans des milieux de pH 4,5 à 8,5. (H. Dusi). Les essais suivants ont été réalisés.

Liste des acides aminés ajoutés au milieu à l'asparagine-acétate de sodium :

1. glucosamine ;
2. glucosamine + lysine ;
3. glucosamine + lysine + tryptophane ;
4. glucosamine + tryptophane ;
5. lysine ;
6. tryptophane ;
7. lysine + proline + cystine + tyrosine + phénylalanine
+ acide glutaminique + tryptophane + leucine ;
8. proline ;
9. cystine ;
10. tyrosine ;
11. phénylalanine ;
12. acide glutaminique ;
13. tryptophane + cystine ;
14. leucine ;
15. cystine + tryptophane + lysine ;
16. glucosamine + cystine ;
17. cystine + tryptophane + lysine + glucosamine ;
18. tryptophane + acide glutaminique + leucine + tyrosine
+ cystine ;
19. proline + glucosamine ;
20. acide glutaminique + phénylalanine + tyrosine + cystine
+ proline + glucosamine ;
21. glucosamine ;
22. glucosamine + lysine + tryptophane + cystine ;
23. cystine + tyrosine ;
24. acide glutaminique + phénylalanine + tyrosine + cystine
+ proline + lysine + glucosamine + tryptophane
+ leucine.
25. tyrosine + acide glutaminique + leucine + cystine +
proline + tryptophane + glucosamine ;
26. tyrosine + acide glutaminique + leucine + cystine +
proline + tryptophane + glucosamine + lysine ;
27. cystéine + glucosamine ;
28. cystine + tryptophane ;
29. cystine + lysine ;
30. proline + cystine + tyrosine + phénylalanine + acide
glutaminique + leucine ;

31. proline + cystine + tyrosine + phénylalanine + acide glutaminique + leucine ;
32. lysine + cystine ;
33. glucosamine + cystine ;
34. glucosamine + cystine.

Tous ces milieux ont été ensemencés avec III gouttes d'une culture en asparagine + acétate de sodium, premier repiquage en ce milieu à partir du milieu peptoné d'entretien (voir p. 84) la souche utilisée ayant été maintenue 11 mois à l'obscurité avant le commencement de ces expériences.

Tous les résultats ont été négatifs. La plupart des tubes ont montré vers le 17^e jour, certains quelques rares flagellés, d'autres des formes palmelloïdes. Au 30^e et au 40^e jour, il n'y avait plus que des palmelles très rares, pas plus nombreuses que celles observables dans les tubes témoins : asparagine + acétate de sodium.

Après 30 mois à l'obscurité. — Après ces essais négatifs, les expériences sur *Euglena gracilis* furent momentanément interrompues. La souche à l'obscurité fut toutefois entretenue en milieu peptoné.

Mais en janvier 1931, au cours d'une conversation, A. SIGOT nous faisait part de résultats différents des nôtres concernant la nutrition d'une souche d'*Euglena gracilis* isolée par lui à Strasbourg, et qui manifestait notamment un pouvoir de synthèse plus élevé que la souche de Prague que nous avions étudiée. Nous décidions de refaire nos expériences, notre souche ayant passé alors 24 mois à l'obscurité. Les nouvelles expériences durèrent 6 mois, janvier 1931 à décembre 1931.

Les milieux utilisés furent les mêmes que dans les premiers essais :

- Milieu minéral + asparagine = 0,
- Milieu minéral + asparagine + acétate de sodium = 0,
- Milieu minéral + soie hydrolysée = 0,
- Milieu minéral + soie hydrolysée + acétate de sodium = 0,
- Milieu minéral + peptone pancréatique de muscle = 0,
- Milieu minéral + peptone pancréatique de muscle + acétate de sodium = très bonnes cultures,
- Milieu minéral + peptone pepsique de muscle = 0.

Les différences avec les résultats de 1929 sont bien mises en évidence dans le tableau ci-dessous.

EUGLENA GRACILIS
Nutrition azotée et nutrition carbonée.

	Nitrates	Sels d'ammonium	Asparagine	Asparagine + acétate de Na	Soie hydrolysée	Soie hydrolysée + acétate de Na	Peptone pancréatique (muscle)	Peptone pancréatique + acétate de Na	Peptone pepsique (muscle)	Peptone pepsique + acétate de Na	Peptone pepsique (arachide)	Peptone pepsique (arachide) + acétate de Na
Lumière . .	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Premiers mois à l'obscurité.	o	o	o	o	±	++	±	++	++	++		
Race stable à l'obscurité .	o	o	o	o	o	o	o	++	o	++	o	++

++ Culture très riche.
+ Culture moyenne.
± Culture pauvre.
o Pas de culture.

Nous voyons donc qu'une source carbonée indépendante, (acide acétique), est devenue indispensable au développement des cultures : absence de culture en peptone pancréatique de muscle qui avait permis en 1929 une culture pauvre mais repiquable, et surtout en peptone pepsique de muscle qui avait permis 9 repiquages.

Donc, nécessité d'une source carbonée organique indépendante. De plus, la soie hydrolysée qui permettait, additionnée d'acétate de sodium, d'obtenir des développements abondants, est devenue inutilisable. Seules, permettent la culture, les peptones pancréatique et pepsique de muscle. Ce sont précisément ces peptones qui sont nécessaires et suffisantes au cilié *Glaucoma piriformis*. Au point de vue de ses besoins azotés, *Euglena gracilis*, après 30 mois de culture à l'obscurité, se comporte donc exactement comme *Glaucoma piriformis* (A. LWOFF et H. DUSI, 1931).

La nutrition carbonée.

Nous avons vu qu'une source carbonée indépendante est devenue indispensable. Dans nos premiers essais, le composé carboné était représenté par l'acide acétique, donné sous forme de son sel de sodium.

Nous avons essayé de remplacer l'acide acétique par les sels de sodium des acides suivants :

- 1° Acides lactique,
tartrique,
malique,
pyruvique,
citrique,
succinique,
glycérophosphorique.

Aucun de ces acides n'a pu servir d'aliment carboné (A. LWOFF et Dusi, 1931).

- 2° Acides acétique,
propionique,
butyrique normal,
isobutyrique,
valérianique normal,
caproïque normal,
diéthylacétique,
œnanthylique normal,
caprylique normal.

Certains de ces acides permettent des cultures très riches contenant jusqu'à 250 flagellés par millimètre cube (nous donnons les résultats de numérations effectuées au 5^e repiquage). Ce sont les acides acétique, butyrique normal et caproïque normal.

Avec les acides propionique et valérianique normal, on a des cultures de densité moindre, 35 à 140 flagellés par millimètre cube.

Les acides isobutyrique et diéthylacétique permettent, au premier repiquage, une culture très lente et très pauvre, plutôt une survie qu'un développement, et non repiquable.

Les acides cénanthylique normal et caprylique normal ne permettent pas du tout la multiplication des Euglènes.

On voit donc que les seuls acides pouvant servir d'aliment carboné à *Euglena gracilis* sont les acides de la série grasse, à chaîne linéaire, dont la molécule renferme moins de 7 atomes de carbone. Les plus favorables sont ceux qui ne renferment pas de groupement CH_2 (acide acétique), ou qui en renferment un nombre pair, 2 : acide butyrique, ou 4 : acide caproïque normal. Ceux qui renferment un nombre impair de groupements CH_2 , un seul : acide propionique, ou 3 : acide valérianique normal, peuvent servir d'aliment carboné, mais sont moins favorables que les précédents. Enfin, la forme isomère de l'acide butyrique, l'acide isobutyrique, et l'acide diéthylacétique, isomère de l'acide caproïque, sont inutilisables.

EUGLENA GRACILIS

Nutrition carbonée à l'obscurité.

	Aliment azoté : peptone
Acide acétique	— ++
» propionique normal	+
» butyrique normal	++
» isobutyrique	o
» valérianique normal	+
» caproïque normal	++
» diéthylacétique	o
» heptylique normal	o
» octylique normal	o
» phénylacétique	o
» pyruvique	o
» lactique	o
» tartrique	o
» malique	o
» succinique	o
» citrique	o
» glycérphosphorique	o

Rappelons que *Polytoma uvella* ne peut utiliser que les acides acétique et butyrique normal.

En résumé, après 30 mois de vie à l'obscurité, il faut fournir à *Euglena gracilis* :

1° Pour sa nutrition azotée, les mêmes peptones complexes, produits d'hydrolyse pepsique ou trypsique de muscle, nécessaires et suffisants pour *Glaucoma piriformis* ;

2° Pour sa nutrition carbonée, un acide de la série grasse à chaîne linéaire, renfermant dans sa molécule moins de 7 atomes de carbone et de préférence un nombre pair de groupements CH_2 .

La décoloration d' « *Euglena gracilis* ».

ZUMSTEIN (1900) a isolé en culture pure une souche d'*Euglena gracilis* qu'il a réussi à priver de chlorophylle par deux procédés différents : 1° par culture à l'obscurité ; 2° par culture en milieu organique à la lumière.

Décoloration à l'obscurité. — Il est très facile d'obtenir la disparition de la chlorophylle chez *Euglena gracilis* (ZUMSTEIN, TERNETZ, PRINGSHEIM, MAINX, LWOFF et DUSI). TERNETZ (1912) a montré qu'il y a, à l'obscurité, persistance des plastes (leucoplastes). Reportées à la lumière ces formes incolores verdissent rapidement (TERNETZ, PRINGSHEIM, MAINX), même après trois ans de vie à l'obscurité (LWOFF et DUSI). Ceci est vrai aussi bien pour la souche étudiée par ZUMSTEIN et TERNETZ que pour la souche de Prague.

Décoloration à la lumière. — En cultivant *Euglena gracilis* à la lumière dans un milieu peptoné, ZUMSTEIN, puis TERNETZ en travaillant sur la même souche ont obtenu des formes incolores, totalement dépourvues de plastes. Ces formes sont définitivement décolorées.

La souche de Prague d'*Euglena gracilis* n'a jamais pu être décolorée à la lumière (PRINGSHEIM, MAINX, LWOFF et DUSI).

On ne peut cependant douter que ZUMSTEIN et TERNETZ aient réellement obtenu la décoloration définitive d'une souche d'*Euglena gracilis*. On doit admettre que ces auteurs ont eu entre les mains une race différente de celle de Prague qui ne se décolore pas à la lumière. Il serait du plus grand intérêt de retrouver cette variété que, pour la commodité des discussions, nous appellerons *Euglena gracilis* var. *zumsteini* nov. var.

« *Euglena gracilis* » et les autres Euglènes.

Il existe dans la famille des Eugléniens de nombreuses formes, espèces ou variétés, sans chlorophylle. Aucune de ces formes n'a été à notre connaissance obtenue en culture pure. Nous ne possédons donc aucun renseignement sur leur pouvoir de synthèse. Par contre, nous avons des données assez précises sur un certain nombre d'Euglènes à chlorophylle. Ont été particulièrement étudiées : *Euglena cyclopicola*, *E. deses*, *E. klebsii*, *E. anabæna*, *E. pisciformis*. D'après MAINX (1928) *Euglena cyclopicola* peut se multiplier à l'obscurité, propriété que ne posséderait aucune des espèces sus-nommées. *Euglena deses*, *klebsii*, *anabæna*, *pisciformis* ne peuvent vivre qu'à la lumière.

NUTRITION AZOTÉE DE QUELQUES EUGLÈNES A LA LUMIÈRE
(d'après Hisatake DUSI, inédit).

	Nitrates	Sels d'ammonium	Acides aminés	Peptones
<i>Euglena stellata</i>	++	++	++	++
» <i>gracilis</i>	+	++	++	++
» <i>klebsii</i>	+	++	++	++
» <i>anabæna</i>	o	+	++	++
» <i>deses</i>	o	o	++	++
» <i>pisciformis</i>	o	o	o	++

Si on supprime le CO₂ du milieu de culture et qu'on fournisse aux flagellés le carbone sous forme des composés suivants : acétate de sodium, butyrate de sodium, propionate de sodium, lactate de calcium, tartrate de potassium, citrate de sodium, malate de potassium, il n'y a aucun développement. MAINX tire de ses

expériences une conclusion fort intéressante : les Euglènes en question sont facultativement hétérotrophes pour le métabolisme azoté et obligatoirement autotrophes pour l'assimilation du carbone.

Les expériences de MAINX ont été reprises par Hisatake Dusi qui a confirmé les résultats relatifs à la nécessité de la lumière. Le milieu pour la culture à l'obscurité employé par Dusi était le milieu peptoné additionné d'acétate de sodium, ajusté pour chaque espèce au pH optimum correspondant.

Mais Dusi n'arrive pas à obtenir le repiquage en série de certaines espèces à la lumière dans le milieu où l'azote est fourni sous forme de sels minéraux : nitrate de calcium, de potassium, de sodium, nitrate, phosphate et sulfate d'ammonium. Il faut fournir à *Euglena deses* et *pisciformis* une source azotée organique ; *Euglena deses* peut se multiplier dans des milieux où l'aliment azoté est représenté par un seul acide aminé. *Euglena pisciformis* ne peut se développer dans aucun des milieux renfermant l'un des acides aminés suivants : asparagine, acides aspartique et glutamique, proline, lysine, leucine, alanine, sérine, glycocolle, valine, tyrosine, histidine, phénylalanine, tryptophane, arginine. On n'obtient de cultures en série d'*Euglena pisciformis* que si on lui fournit les mêmes peptones complexes, nécessaires pour la croissance et la multiplication de *Glaucoma piriformis* ou d'*Euglena gracilis* à l'obscurité (H. Dusi, 1930-1931). Nous reviendrons sur ces faits lorsque nous comparerons la nutrition des divers Protistes.

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE PREMIER

COMPARAISON DU POUVOIR DE SYNTHÈSE DE DIVERS ORGANISMES

Comparaison des Protistes eucaryotes.

Nous allons résumer brièvement les caractères physiologiques propres aux espèces que nous avons étudiées.

1° *Polytoma uvella*. — Il résulte des travaux de PRINGSHEIM, que nous avons confirmés et étendus, que *Polytoma* peut effectuer la synthèse de tous ses constituants azotés à partir de corps azotés simples, minéraux, sels d'ammonium, ou organiques : glycolle, asparagine, cystéine, glucosamine. Nous remarquerons que cette nutrition aux dépens de corps azotés organiques simples revient à la nutrition aux dépens des sels d'ammonium. Ces deux modes impliquant une synthèse de tous les acides aminés, sauf probablement de celui qui sert de source azotée à partir de NH_3 et des acides ternaires correspondants. Ces divers acides ^{organiques} ~~amino~~ dérivent probablement de l'hydrolyse des réserves glucidiques figurées. Une source carbonée organique indépendante est indispensable ; seuls sont utilisables les acides acétique et butyrique normal.

2° *Glaucoma piriformis*. — Des peptones complexes résultant de l'hydrolyse pepsique ou trypsique peu poussée de protides (muscle) sont nécessaires à *Glaucoma piriformis*. Ces peptones renferment des protéoses, des polypeptides complexes et des acides aminés libres. La présence de certains peptides est

probablement indispensable et il est vraisemblable également que *Glaucoma piriformis* est incapable d'effectuer la synthèse de certains acides aminés fondamentaux. *Glaucoma piriformis* attaque certains glucides, mais la présence dans le milieu d'une source carbonée organique indépendante n'est pas nécessaire.

3° *Chlamydomonas agloëformis* et *Hæmatococcus pluvialis*. — Cultivés à l'obscurité, ces deux Chlorophytes montrent les mêmes potentialités élevées du pouvoir de synthèse azoté que *Polytoma uvella*. Ils font la synthèse de tous leurs acides aminés à partir de corps organiques simples. Une source carbonée indépendante ne leur est pas indispensable. L'addition de composés carbonés favorables (les mêmes que pour *Polytoma* : acide acétique ou butyrique) améliore cependant beaucoup le développement.

Chlamydomonas et *Hæmatococcus* font la synthèse de la chlorophylle à l'obscurité.

4° *Euglena gracilis*. — Cultivée à l'obscurité, *Euglena gracilis* perd sa chlorophylle. Dans les premiers mois de sa vie à l'obscurité, *Euglena gracilis* peut se multiplier en bouillon peptoné ou en peptone (ZUMSTEIN, TERNETZ, PRINGSHEIM, MAINX, LWOFF et DUSI). Mais lorsqu'est réalisée ce que nous avons appelé la stabilité physiologique, il faut fournir à *Euglena gracilis*, en plus des corps azotés nécessaires et suffisants à *Glaucoma piriformis* (peptones complexes), une source carbonée organique qui doit obligatoirement appartenir à la série grasse, renfermer dans sa molécule — qui doit être à chaîne linéaire — moins de 7 atomes de carbone, et, de préférence, un nombre pair de groupements CH_2 : acides acétique, propionique, butyrique, valérianique et caproïque normaux (LWOFF et DUSI).

Les divers Chlorophytes et Protozoaires que nous avons étudiés présentent donc des différences physiologiques considérables. Ces différences portent essentiellement sur la nutrition azotée (pouvoir de synthèse des acides aminés) et sur la nutrition carbonée (nécessité d'une source carbonée indépendante). Nutrition carbonée et azotée seront étudiées séparément.

I. — *Nutrition azotée*. — Il faut distinguer naturellement les Chlorophytes et les Protozoaires.

Les Chlorophytes que nous avons étudiés étant des Protistes eucaryotes à chlorophylle sont autotrophes à la lumière, c'est-

	Sels d'ammonium + acétate de Na	Asparagine	Asparagine + acétate de Na	Peptone de muscle	Peptone + acétate de Na	Peptone + sang 1/20.000	Peptone + sang 1/5.000	Peptone + sang 1/1.000	Peptone + sang 1/500	Peptone + sang (dose ?)	Bouillon peptoné + sang (dose ?)	Bouillon acide + sang (sous vaseline)	Eléments figurés (Bactéries, protides (coagulés, etc...))		
* <i>Chlamydomonas agloëformis</i>	o	o	+	+	+									M. et A. LWOFF	1929
• <i>Hematoxococcus pluvialis</i>	+	+	+	+	+									M. et A. LWOFF	1929
<i>Polytoma uella</i>			+	+	+									E. G. PRINGSHEIM	1921
• <i>Euglena gracilis</i>	o	o	o	o	+									A. LWOFF	1929-1931
<i>Glauconia piriiformis</i>		o	+	+	+									A. LWOFF et H. Dusi	1929-1931
<i>Strigomonas oncopelli</i>		o	+	+	+									A. LWOFF	1923-1929
														M. LWOFF	1931
<i>Strigomonas fasciculata</i>														M. LWOFF	1930
<i>Leptomonas pyrrochorts</i>														G. ZOTTA	1923
<i>Leptomonas ctenocephali</i>														M. LWOFF	1928
<i>Leishmania donovani</i>														LAVERAN et PETIT	1910
<i>Schizotrypanum cruzi</i>														M. LWOFF	1929
<i>Trypanosoma theileri</i>														MIYAJIMA	1907
<i>Trichomastix</i> du gecko												+		E. CHATTON	1918
Amibes (<i>Vahlkampfia</i>)													+	TSUTSUKI	1898
Amibes, <i>Bodo</i> , <i>Provaegelia</i>													+	CEHLER	1916-1924
<i>Colpoda steini</i> , <i>C. cucullus</i>													+	CEHLER	1916-1924
<i>Colpidium colpoda</i>													+	E. et M. CHATTON	1923-1929
<i>Glauconia scintillans</i>													+	E. et M. CHATTON	1923-1929
<i>Acanthameba castellanii</i>													+	A. LWOFF	1932

* Organismes autotrophes à la lumière.

* Organismes autotrophes à la lumière.

à-dire qu'ils peuvent se multiplier indéfiniment dans des milieux minéraux où l'azote est fourni sous forme de sels minéraux, le CO_2 atmosphérique étant assimilé grâce à la photosynthèse.

Parmi les Protozoaires, Protistes eucaryotes sans chlorophylle, nous devons distinguer du point de vue de la nutrition azotée deux types physiologiques différents.

Les uns, que nous avons appelés « mésotrophes », peuvent utiliser des sources azotées minérales ou organiques simples (acides aminés). En ce qui concerne la synthèse des protides, la nutrition aux dépens de sels d'ammonium ou d'acides aminés revient d'ailleurs au même, toute question d'énergétique étant mise de côté, c'est-à-dire à la synthèse des acides aminés constitutifs à partir de NH_3 et des acides ternaires correspondants, le groupement NH_2 dérivant par désamination des acides aminés. La synthèse des acides aminés est suivie d'une synthèse des peptides et des protéines.

Le type de ce groupe des mésotrophes est *Polytoma uvella*. D'autres Chlamydomonadinées vertes, autotrophes à la lumière, se comportent, au point de vue de leur nutrition azotée, comme *Polytoma*, lorsqu'on supprime la photosynthèse par culture à l'obscurité. Ce sont *Chlamydomonas agloëformis* et *Hæmatococcus pluvialis*.

Les autres, que nous avons appelés « hétérotrophes vrais » mais que nous nommerons désormais « métatrophes » (voir p. 111 et suivantes), ont besoin de solutions de polypeptides complexes, très probablement parce qu'ils ne peuvent effectuer la synthèse des acides aminés fondamentaux et de certains peptides. Le type de ces métatrophes est *Glaucoma piriformis*. La race stable de *Euglena gracilis* à l'obscurité montre exactement les mêmes besoins azotés, ainsi que le Trypanosomide *Strigomonas* (*Leptomonas*) *oncopelti*.

Les autres Trypanosomides ont les mêmes besoins azotés, mais une substance activante agissant à très faible dose leur est nécessaire (ZOTTA, M. LWOFF). La substance active du sang est l'hématine (M. LWOFF). L'action de l'hématine est liée à son activité peroxydasique ; elle peut être en effet remplacée pour la culture de *Strigomonas fasciculata*, par la peroxydase artificielle de WOLFF (ferrocyanure de fer colloïdal) à condi-

tion que cette peroxydase soit stabilisée par un colloïde protecteur (M. LWOFF).

TRYPANOSOMIDES
d'après M. LWOFF (inédit).

	Peptone pepsique de muscle ou d'arachide	Bouillon peptoné	Peptone pepsique + sang 1/20.000	Peptone pepsique + sang 1/5.000	Peptone pepsique + sang + 1/1.000	Peptone pepsique + sang > 1/1.000
<i>Strigomonas oncopelti</i>	++	++	++	++	++	++
<i>Strigomonas fasciculata</i>	o	+	+	++	++	++
<i>Leptomonas pyrrocoris</i>	o	o	o	+	++	++
<i>Leptomonas clenoccephali</i>	o	o	o	o	+	++

Nous avons vu, dans le chapitre relatif aux phagotrophes obligatoires, que ceux-ci étaient très probablement des métatrophes s. s., leur nutrition s'effectuant aux dépens des produits d'hydrolyse trypsique des protides, hydrolyse qui a lieu dans les vacuoles digestives. Le fait que *Glaucoma piriiformis* est normalement phagotrophe dans la nature apporte à cette manière de voir un argument important.

Nous ne connaissons pas actuellement d'intermédiaire entre les mésotrophes et les métatrophes.

Comparaison entre les pouvoirs de synthèse de quelques organismes. — Pour la commodité de l'exposé qui va suivre, nous réservons le nom de « protozoaires » aux Protistes eucaryotes dépourvus de plastes et de chlorophylle. La frontière entre les Protozoaires et les Métazoaires est très facile à tracer. Au contraire, il y a, entre les Protistes eucaryotes manifestement animaux et les Protistes eucaryotes manifestement végétaux, une série d'intermédiaires. Il eût été commode d'employer le terme « Protophytes » pour désigner les Eucaryotes possédant

un plaste et de la chlorophylle ; mais le terme protophyte a une autre acception. D'autre part, il existe entre les organismes végétaux appartenant aux Protistes et les Métaphytes, une série continue d'intermédiaires. Il est donc impossible de délimiter un groupe de Protistes eucaryotes végétaux. Cependant, beaucoup de végétaux font partie des Protistes. Pour la commodité de l'exposé, nous appellerons « Chlorophytes » les végétaux non cellulaires possédant plaste et chlorophylle et « Leucophytes », ceux qui possèdent un plaste mais pas de chlorophylle. Lorsque nous parlerons de végétaux supérieurs, nous emploierons le terme de Métaphytes.

Les Protistes eucaryotes seront donc divisés en trois groupes :

- a) les *Chlorophytes*, possédant un plaste et de la chlorophylle ;
- b) les *Leucophytes*, possédant un plaste, mais pas de chlorophylle ;
- c) les *Protozoaires*, ne possédant ni plaste, ni chlorophylle.

Ces divisions n'ont en aucune façon la prétention de représenter des séries naturelles : un même organisme peut présenter des variétés dont chacune appartienne à l'un des trois groupes dont nous avons donné la définition ; tel *Blastodinium spinulosum*, péridinien parasite de l'estomac des Copépodes pélagiques, qui présente des formes possédant plaste et pigment, des formes avec plaste mais dépourvues de pigment et enfin des formes ne présentant ni plaste, ni pigment (E. CHATTON). On peut aussi transformer expérimentalement des Chlorophytes en leucophytes ou en protozoaires, et il existe, nous l'avons dit, des intermédiaires entre les Eucaryotes chlorophytes et les Métaphytes.

I. — *Pouvoir de synthèse de quelques Chlorophytes à l'obscurité.* — La grande majorité des Chlorophytes sont autotrophes à la lumière (nous renvoyons pour l'exposé de cette question au travail de KUFFERATH, 1929). Un certain nombre d'entre eux peuvent vivre à l'obscurité si on leur fournit un aliment azoté organique convenable ; cependant il ne paraît pas qu'aucun des organismes que nous allons citer ait été cultivé sur milieux synthétiques, ce qui rend l'interprétation des résultats assez difficiles.

BOUILHAC (1898) a cultivé *Nostoc punctiformis* à l'obscurité et il a constaté qu'il continuait à former de la chlorophylle.

RADAIS (1900) a cultivé *Chlorella vulgaris* à l'obscurité sur de la pomme de terre et de l'extrait de malt. *Chlorella vulgaris* est restée verte à l'obscurité.

MATRUCHOT et MOLLIARD (1902) ont pu entretenir *Stichococcus bacillaris* Næg. var. *major* à l'obscurité sur navet et sur potiron. *Stichococcus* est resté vert à l'obscurité.

CHARPENTIER (1903) a cultivé *Cystococcus humicola* Næg. à l'obscurité, mais n'indique pas le nombre de repiquages qu'il y a effectués. D'après cet auteur, *Chlorella vulgaris* reste verte à l'obscurité (aucune donnée chronologique).

DANGEARD (1921) a entretenu à l'obscurité pendant 8 ans une souche de *Scenedesmus acutus* (souche CHODAT) dans le milieu suivant :

Eau distillée	1.000
Nitrate de calcium	0,5
Chlorure de potassium	0,5
Sulfate de magnésium	0,5
Phosphate de potassium	0,5
Sesquioxyde de fer	traces
Glucose	10
Peptone	0,8
Gélose	20

Il est inutile d'allonger la liste de ces travaux. Du point de vue qui nous occupe, nous noterons seulement que tous les organismes étudiés sont restés verts à l'obscurité. Tous les auteurs cités ont entretenu leurs cultures sur des milieux naturels : potiron, navet, pomme de terre, ou sur des milieux artificiels contenant de l'extrait de malt, de la peptone, ce qui rend impossible toute déduction relative au pouvoir de synthèse des composés azotés par les organismes en question.

Cependant, une conclusion relativement importante peut en être tirée en ce qui concerne les besoins carbonés : *Chlorella*, *Cystococcus*, *Stichococcus*, *Scenedesmus*, qui conservent leur chlorophylle à l'obscurité, se multiplient parfaitement dans des milieux dépourvus d'acides gras. La signification de ce fait sera discutée dans le paragraphe suivant ; il vient à l'appui de notre manière de considérer l'oxytrophie comme liée à la présence du plaste et à l'absence de chlorophylle (v. p. 120).

II. — *Champignons*. — PASTEUR (1858-60) a montré que les Levures (*Saccharomyces*) et les Moisissures (*Penicillium*) peuvent se nourrir avec des sels d'ammonium comme seule source azotée. Milieu de Pasteur :

Sucre candi pur	100
Cendres de levure	1
Tartrate droit d'ammonium.	0,1

Dans ces conditions, une source carbonée organique est nécessaire qui peut être constituée par de nombreux acides appartenant à des séries variées ou par des glucides. Si les levures sontensemencées en milieu peptoné, une source carbonée indépendante n'est pas nécessaire.

Donc, possibilité pour les Levures de faire la synthèse de tous les acides aminés et, dans ces conditions, non-spécificité de la source carbonée organique indispensable si l'aliment azoté est minéral, mais qui devient inutile dans les milieux peptonés.

RAULIN (1870), étudiant la nutrition d'*Aspergillus niger*, confirme le résultat fondamental de PASTEUR et démontre que l'*Aspergillus* est capable de faire la synthèse de ses constituants à partir de sources azotées minérales. Il démontre en plus, on peut le rappeler ici, le rôle essentiel du magnésium, du soufre, du zinc et du silicium.

Nous pouvons distinguer chez les Champignons inférieurs deux types physiologiques : les uns (*Aspergillus*) sont capables de réduire les nitrates en présence d'une source carbonée organique convenable, en particulier en présence de glucides. D'autres sources carbonées ne permettent pas le développement aux dépens des nitrates, mais seulement aux dépens des sels d'ammonium.

Les autres, la plupart des Mucorinées, les levures, sont incapables de réduire les nitrates et ont besoin, pour leur nutrition azotée, de sels d'ammonium. Enfin, avec des sources azotées organiques convenables, peptones, certains acides aminés, une source carbonée indépendante n'est pas nécessaire. Nous n'insistons pas sur les données que l'on trouve exposées dans tous les traités classiques mais nous dirons quelques mots des caractères biochimiques propres à certains Champignons parasites.

Le *Saprolegnia* sp., Champignon qui se développe sur des matières organiques vivantes ou mortes (cadavres de mouches, poissons), peut être isolé en culture pure et entretenu en milieu peptoné.

VOLKONSKY (1932 *a* et *b*) a montré que le *Saprolegnia* est incapable de se développer dans les milieux à base de nitrates ou de sels d'ammonium ou d'un seul acide aminé à moins que cet acide aminé unique ne renferme un groupement SH. Un milieu synthétique à base de cystéine permet d'excellentes cultures de même qu'un milieu à base d'alanine additionné d'une petite quantité de cystéine. Enfin toujours en présence d'alanine, VOLKONSKY a réussi à remplacer la cystéine par le sulfure d'ammonium, le sulfocarbonate de potassium, l'hyposulfite de sodium, tous composés renfermant des groupements SH ou SS.

Le sulfate de potassium, le sulfate de magnésium, le sulfovinat de potassium, qui ne renferment que des groupements SO_4 — pas de SS ou de SH — ne permettent pas de développement. La seule différence entre *Saprolegnia* et un Champignon libre est que *Saprolegnia* a perdu le pouvoir de réduire les sulfates en SH.

Nous trouvons donc chez les Levures et chez les Champignons : 1° des organismes réduisant les nitrates comme les Chlorophytes à la lumière ; 2° des organismes incapables de réduire les nitrates mais pouvant utiliser les sels d'ammonium comme *Polytoma uvella*.

4° Pour aucun des organismes en question, avec une source azotée convenable, une source carbonée organique indépendante n'est nécessaire. D'autre part, un grand nombre de corps carbonés (acides divers : lactique, tartrique, malique..., glucides) peuvent servir d'aliment carboné en présence d'un aliment azoté minéral.

III. — *Bactéries*. — Nous pouvons classer les Bactéries en quatre groupes physiologiques :

- 1° les bactéries capables de se nourrir de composés minéraux ;
- 2° les bactéries ayant besoin de composés organiques simples ;
- 3° les bactéries ayant besoin de substances organiques complexes ;
- 4° les bactéries ayant besoin de substances organiques com-

plexes et de substances « activantes » agissant à très faible dose.

1° Les travaux classiques de WINOGRADSKY ont montré que certaines bactéries du sol sont capables d'assimiler le carbone du CO_2 atmosphérique grâce à l'énergie fournie par l'oxydation de corps azotés minéraux (sels d'ammonium, nitrites), de composés du soufre, ou de sels de fer. On a retrouvé depuis de nombreuses bactéries qui tirent d'oxydations spécifiques l'énergie nécessaire à leur synthèse ; oxydation de l'hydrogène, du méthane, de l'oxyde de carbone, de l'ammoniaque, des nitrates, des corps sulfurés, des sels de fer et de manganèse.

Chez les bactéries, l'assimilation du CO_2 et la possibilité de se nourrir de corps purement minéraux n'est donc pas liée à la photosynthèse, mais à des oxydations ; ce mode particulier de nutrition a reçu le nom de chimiosynthèse.

2° Bactéries ayant besoin d'un élément organique. Nous trouvons les bactéries fixatrices d'azote qui assimilent l'azote atmosphérique grâce à l'oxydation des glucides. Beaucoup de bactéries peuvent se nourrir aux dépens de nitrates en présence d'une source azotée convenable. Par exemple : *Bacillus subtilis* assimile l'azote nitrique en présence du glucose. Nombre de Bactéries, incapables de réduire les nitrates peuvent utiliser les sels d'ammonium comme le paratyphique B, avec des sources carbonées diverses : acides lactique, acétique, succinique, malique, citrique. Pour le bacille d'EBERTH, certaines souches assimilent l'ammonium, mais seulement avec certaines sources carbonées : acides lactique, citrique, glycérine. Enfin, toutes les bactéries utilisant les sels d'ammonium peuvent se nourrir aux dépens d'acides aminés dont quelques-uns constituent à la fois la source azotée et la source carbonée, comme l'alanine pour des souches de paratyphique A, alors que d'autres comme le glycolle ne peuvent être assimilés par les paratyphiques A qu'en présence d'une source carbonée organique indépendante (acide lactique, par exemple).

Il n'est pas dans notre dessein de nous étendre plus longuement ici sur ce sujet et nous renvoyons le lecteur que ces questions intéressent aux travaux de BRAUN et CAHN-BRONNER (1921-1922), de BRAUN et KONDO (1924) et à la monographie de DE JONG (1926).

3° Un grand nombre de Bactéries sont incapables de se multiplier dans des milieux organiques simples et ont besoin comme les Protozoaires de corps azotés organiques complexes : peptone. Une source carbonée indépendante n'est jamais indispensable.

4° Enfin, certaines bactéries ont besoin, en plus de ces peptones complexes, de substances activantes agissant à très faible dose, sang, hémoglobine ou hématine pour le bacille de PFEIFFER.

Donc toutes les possibilités de synthèse azotée sont réalisées chez les bactéries : nutrition aux dépens de nitrates, de sels d'ammonium, d'acides aminés, de polypeptides complexes. Certaines bactéries ont besoin des mêmes facteurs activants, corps à fonction peroxydasique, que les Protozoaires parasites (Trypanosomides).

CHAPITRE II

CLASSIFICATION PHYSIOLOGIQUE

Historique.

Les organismes vivants sont généralement classés d'après PFEFFER en : autotrophes, mixotrophes et hétérotrophes ou allotrophes. Les autotrophes assimilent l'acide carbonique et les sels azotés minéraux. Ils sont aussi appelés « holophytes » (BÜTSCHLI, KLEBS), « autophytes » (BEIJERINK). Les mixotrophes assimilent l'acide carbonique et absorbent en même temps des substances organiques. Ils ont été appelés aussi « semi-saprophytes ». Enfin, les hétérotrophes ou allotrophes, désignés aussi sous le nom de « saprophytes », ont besoin de substances organiques.

Pour beaucoup d'auteurs, tous les organismes possédant la fonction chlorophyllienne sont des autotrophes. La mixotrophie ou semi-saprophytisme n'est qu'un mode particulier de nutrition d'un organisme autotrophe qui absorbe des substances organiques, lesquelles ne lui sont pas indispensables. Or, nous avons vu (p. 93) que tous les organismes à chlorophylle ne peuvent utiliser les sels azotés minéraux ; certains ont besoin de corps azotés organiques simples, acides aminés, ou complexes, peptones. Les placerons-nous dans les autotrophes ou parmi les hétérotrophes ? Des premiers, ils possèdent la fonction chlorophyllienne, des seconds, les besoins azotés. Ce ne sont pas non plus des mixotrophes, la mixotrophie n'ayant jamais été définie par le caractère organique obligatoire de l'aliment azoté.

D'autre part, entre les organismes hétérotrophes qui n'assimilent pas CO_2 et ont besoin de substances organiques, nous trouvons des différences physiologiques considérables. Les uns peuvent assimiler les nitrates et les sels d'ammonium en présence d'une source carbonée organique. On dit qu'ils sont autotrophes au point de vue de la nutrition azotée et hétérotrophes au point

de vue de la nutrition carbonée. D'autres ont besoin d'acides aminés ; d'autres, de peptones. L'aliment azoté, comme l'aliment carboné doit être organique. Ils sont hétérotrophes. Mais les uns font la synthèse de tous leurs acides aminés à partir de NH_3 . Il résulte en effet des travaux récents (voir BACH, 1925, G. KLEIN, 1928) que chez les Champignons comme chez les végétaux à chlorophylle, la transformation des nitrates en acides aminés a pour étapes intermédiaires un stade NO_2 et un stade NH_3 . Les autres ont besoin, pour constituer leurs protides, de polypeptides complexes.

Les classifications bactériologiques sont passibles de critiques analogues : A. FISCHER (1903) divise les bactéries en *prototrophes*, organismes fixant l'azote atmosphérique, et *métatrophes*, organismes ne fixant pas l'azote atmosphérique ; ces derniers divisés eux-mêmes en *autotrophes*, qui peuvent vivre aux dépens de carbone et d'azote minéraux, et *hétérotrophes*, qui ont besoin de substances organiques. Au point de vue plus particulier des besoins azotés, FISCHER distingue : des *Peptonbakterien* — auxquelles l'azote doit être fourni sous forme d'albuminoïdes pour obtenir une croissance optimale ; des *Amidobakterien* — qui ont besoin d'amides et ne se développent pas dans les milieux aux sels d'ammonium ; des *Ammonbakterien* — qui peuvent se développer avec NH_3 comme aliment azoté et des *Nitrobakterien* — qui peuvent utiliser l'azote oxydé.

FISCHER n'envisage pas les potentialités physiologiques maxima des organismes et classe les bactéries d'après la nature de l'aliment azoté le plus favorable. C'est ainsi que *B. coli*, qui peut vivre aux dépens des nitrates est classé dans les *Ammonbakterien* et *B. typhi* dont certaines souches peuvent utiliser les sels d'ammonium est classé dans les *Amidobakterien*.

ORLA JENSEN (1909) propose une autre classification : les bactéries seront réparties en trois groupes :

1° Bactéries qui peuvent se nourrir aux dépens de corps azotés et carbonés minéraux.

2° Bactéries qui ont besoin d'une source carbonée organique, mais peuvent utiliser une source azotée minérale.

3° Bactéries qui ont besoin d'une source azotée et carbonée organique.

Cette classification a été adoptée par HARDEN (1930).

Nous remarquerons que les bactéries du groupe 2 ont en commun avec certaines bactéries du groupe 3 la possibilité de faire la synthèse de tous leurs acides aminés à partir de NH_3 . Et nous trouvons précisément parmi les diverses souches d'une même bactérie, des organismes se développant à partir aux dépens de nitrates ou de sels d'ammonium, d'autres, ayant besoin d'acides aminés, comme ceci se produit chez certains bacilles typhiques (BRAUN et CAHN-BRONNER, 1922) ou chez certaines souches de Bacille de SHIGA, KISCH (1919).

Ces diverses souches, les unes capables de réduire les nitrates, et d'assimiler les sels d'ammonium, les autres ayant besoin d'acides aminés (1), font cependant la synthèse de tous leurs acides aminés. Elles seront pourtant séparées et, dans le groupe 3 de JENSEN, nous trouverons des bactéries se développant aux dépens d'un seul acide aminé et des bactéries ayant besoin de peptone.

BEIJERINCK a proposé également de classer dans trois groupes les plantes sans chlorophylle :

1° organismes assimilant les nitrates ou les sels d'ammonium ;

2° organismes assimilant l'asparagine ;

3° organismes assimilant les peptones.

Or, dans les organismes assimilant les peptones, BEIJERINCK place ceux qui se développent bien dans les solutions peptonées mais qui sont cependant capables d'utiliser les acides aminés.

G. KLEIN (1928) qui a proposé une classification voisine de celle de BEIJERINCK place *Bacterium coli* dans les « Ammoniakorganismen » ; or, *B. coli* utilise parfaitement les nitrates comme source azotée si on lui fournit des glucides ; il n'a besoin de sels d'ammonium que si la source carbonée organique est peu favorable, glycérine. De même, KLEIN place dans les « Eiweisorganismen » le gonocoque et le bacille du charbon ; ces organismes d'après KLEIN auraient « absolument » besoin d'albumines. Or, si le gonocoque, comme le méningocoque, a besoin d'albumines lorsqu'on l'isole de l'organisme, il s'en passe fort bien au bout de deux ou trois repiquages, et on le cultive alors parfaitement sur le bouillon peptoné gélosé. Il en est de

(1) Et qui sont sérologiquement identiques.

même pour le bacille diphtérique qu'on isole sur sérum coagulé, mais qui se multiplie parfaitement dans les milieux peptonés. Ces organismes peuvent donc utiliser les albumines, mais *celles-ci ne leur sont pas indispensables*.

En outre, ni la classification de FISCHER, ni celle de JENSEN, ni celle de BEIJERINCK ne tiennent compte *à la fois* des besoins azotés et carbonés des organismes. Or, il apparaît nettement que certains organismes peuvent avoir en commun le caractère de leur nutrition carbonée, par exemple, nutrition carbonée aux dépens de CO_2 grâce à l'assimilation chlorophyllienne, alors que les caractères de leur nutrition azotée sont très variables : assimilation des nitrates ou besoin de peptone. Enfin, parmi les organismes ayant les mêmes besoins azotés (peptone), certains réclament une source carbonée organique indépendante, d'autres non.

Il nous a semblé, que pour établir une classification valable pour tous les organismes vivants, il fallait, pour conserver de grandes divisions, tenir compte essentiellement, soit de la nutrition azotée, soit de la nutrition carbonée. Ou plutôt d'établir deux classifications, l'une reposant principalement sur les caractères de la nutrition azotée, l'autre sur ceux de la nutrition carbonée, ou mieux encore, d'une classification à double entrée, les subdivisions étant définies à la fois par les caractères de la source azotée et de la source carbonée

Nous avons, dans la mesure du possible, conservé tous les groupes physiologiques dont la définition était suffisante. Mais nous avons été contraint de créer un certain nombre de groupes nouveaux, désignés par des termes nouveaux, ce dont nous nous excusons auprès des esprits chagrins qui ne manqueront pas de s'en indigner.

Nous pensons en effet qu'un vocabulaire précis et bien défini est seul capable de faciliter l'exposé général de questions relatives à la nutrition.

Classification.

Base de la nomenclature. — Les racines grecques sont seules employées.

Divisions primaires : Tous les termes sont terminés par le radical *trophe*, précédé d'un radical qui définit soit les caractères de la nutrition azotée : *proto*, *auto*, *méso*, *méta*, soit les caractères de la nutrition carbonée : *chimio*, *photo*, *oxy* et *haplo*.

Subdivisions : Le premier radical définit la nutrition carbonée, le second la nutrition azotée, le mot étant terminé par le radical *trophe* commun. Exemple : un organisme à la fois *oxytrophe* et *métatrophe* sera *oxymétatrophe*. Pour la définition des groupes, nous ne tenons compte que du pouvoir de synthèse maximum, c'est-à-dire des besoins alimentaires minima.

Classification basée essentiellement sur le caractère de la nutrition azotée :

1) *Prototrophes* ; nous appelons avec FISCHER : « Prototrophes », les organismes assimilant l'azote moléculaire.

2) *Autotrophes* ; nous définissons avec PFEFFER les « autotrophes » : organismes à nutrition azotée et carbonée minérale. L'énergie nécessaire aux synthèses étant fournie, a) soit par l'oxydation de corps inorganiques : *chimiotrophie*, b) soit par la lumière grâce à l'assimilation chlorophyllienne : *phototrophie*.

Les autotrophes comprennent donc deux groupes :

a) Les chimioautotrophes, autotrophes-chimiotrophes : les Bactéries nitrifiantes.

b) Les photoautotrophes, autotrophes phototrophes : la plupart des plantes vertes.

Remarquons que cette définition exclut des autotrophes les organismes assimilant les nitrates ou les sels d'ammonium seulement en présence d'une source carbonée organique.

3) *Mésotrophes*, organismes capables de faire la synthèse de leurs protides à partir de NH_3 et ayant besoin d'un composé organique.

La synthèse des protides à partir d' NH_3 peut se faire soit à partir du NH_2 des acides aminés, soit à partir des sels d'ammonium, ou des nitrates préalablement réduits, c'est-à-dire à partir de composés azotés minéraux ou organiques simples. Remarquons que lorsqu'un organisme a besoin d'acides aminés, en règle générale, des acides aminés de tous les groupes peuvent servir d'aliment azoté, c'est-à-dire que l'organisme fait la synthèse de tous les acides aminés constitutifs des protides.

Si l'aliment azoté est minéral, une source carbonée organique est indispensable. Si l'aliment azoté est organique, la source d'azote peut servir en même temps de source de carbone : *haplo-trophie*. Mais parfois une source carbonée indépendante est nécessaire quelle que soit la source carbonée : *oxytrophie*. D'autres fois enfin, l'assimilation chlorophyllienne est indispensable : *phototrophie*. Les mésotrophes comprendront donc trois groupes :

a) Les *Photomésotrophes* : exemple, *Euglena deses*.

b) Les *Haplomésotrophes* : la grande majorité des Bactéries, et des Champignons.

c) Les *Oxymésotrophes* : exemple, *Polytoma uwelli*.

4) *Métatrophes*, organismes incapables d'effectuer la synthèse de tous leurs acides aminés à partir de NH_3 . Une source azotée organique complexe est nécessaire (peptone).

Il n'y a pour le moment aucun intermédiaire connu entre les mésotrophes et les métatrophes. Cela ne tient peut être qu'à une lacune de nos connaissances. Mais jusqu'à maintenant aucun organisme métatrophe n'a pu être cultivé en milieu synthétique renfermant les acides aminés indispensables. Il est possible que certains peptides leur soient nécessaires.

Comme les mésotrophes, les métatrophes comprennent des organismes, photo, haplo et oxytrophes.

a) Les *Photométatrophes* : *Euglena pisciformis*.

b) Les *Oxymétatrophes* : *Euglena gracilis* à l'obscurité.

c) Les *Haplométatrophes* : *Glaucoma piriformis*, *Strigomonas* (*Leptomonas*) *oncopelti*.

Classification basée sur les caractères de la nutrition carbonée.

1) *Chimiotrophes* organismes utilisant le carbone minéral grâce à l'oxydation de composés inorganiques.

L'aliment azoté est naturellement minéral et dans certains c'est son oxydation même qui fournit l'énergie nécessaire aux synthèses. Dans d'autres cas, cette énergie est fournie par l'oxydation de composés minéraux les plus divers, du fer, du soufre.

Exemple : les Bactéries nitrifiantes.

2) Les *Phototrophes*, organismes utilisant le carbone du CO_2 grâce à l'énergie lumineuse absorbée par la chlorophylle.

L'aliment azoté peut être minéral (autotrophie), organique

CLASSIFICATION PHYSIOLOGIQUE DES MICROORGANISMES

MÉTATROPHES Un aliment azoté complexe (peptone) est indispensable.		Photométatrophes	Oxymétatrophes	Haplométatrophes
MÉSOTROPHES Synthèse des protides à partir d'NH_3 ; aliment azoté : nitrate, sel d'ammonium ou acide aminé Un composé organique est indispensable.		Photomésotrophes	Oxymésotrophes	Haplomésotrophes
AUTOTROPHES Aliments azoté et carboné minéraux.	Chimioautotrophes	Photoautotrophes		
PROTOTROPHES Assimilation de l'azote moléculaire.				
	CHIMIOTROPHES Assimilent CO_2 grâce à l'oxydation de composés inorganiques	PHOTOTROPHES Assimilent CO_2 grâce à la photosynthèse.	OXYTROPHES Un composé carboné organique indépendant est indispensable, quel que soit l'aliment azoté.	HAPLOTROPHES L'aliment azoté organique peut servir de source carbonée.

simple (mésotrophie) ou organique complexe (métatrophie).

a) *Photoautotrophes* : majorité des plantes à chlorophylle.

b) *Photomésotrophes* : *Euglena deses*.

c) *Photométatrophes* : *Euglena pisciformis*.

3) *Oxytrophes*, organismes ayant besoin d'une source carbonée organique indépendante, quelle que soit la source azotée.

L'aliment azoté peut être minéral ou organique simple (mésotrophie) ou organique complexe (métatrophie).

a) *Oxymésotrophes* : *Polytoma uwella*.

b) *Oxymétatrophes* : *Euglena gracilis* à l'obscurité.

4) Les *Haplotrophes*, le carbone est fourni par la source azotée organique.

Ce groupe comprend la majorité des Bactéries, des Champignons, des Levures et des Protozoaires (*s. s.*).

Nous avons dit que nous ne tenons compte pour établir la classification que des besoins alimentaires minima. C'est-à-dire que les haplotrophes sont des organismes qui n'ont pas besoin de source carbonée organique indépendante si l'aliment azoté est favorable. Il est évident que si l'aliment azoté est minéral, une source carbonée organique est nécessaire. Mais si la source azotée est favorable, tel acide aminé, peptone, la présence d'un glucide ou d'un acide organique n'est pas nécessaire, contrairement à ce qui se passe pour les oxytrophes.

Suivant la nature de l'aliment azoté nécessaire les Haplotrophes sont divisés en :

a) *Haplomésotrophes* : Champignons, levures, la majorité des bactéries.

b) *Haplométatrophes* : *Glaucoma piriformis*.

Les haplométatrophes ont besoin d'une source azotée organique complexe.

Les haplomésotrophes ont besoin d'une source azotée minérale (nitrate, sel d'ammonium) ou bien d'une source azotée organique simple (acide aminé).

Organismes ayant besoin de « substances » activantes.

Nous pouvons avec FISCHER (1903) réserver le nom de « paratrophes » aux organismes ayant besoin, en plus des composés azotés et carbonés, de substances agissant à très faibles doses.

La paratrophie peut exister dans des groupes divers : par

exemple chez les Haplomésotrophes où nous trouvons un Champignon, le *Saprolegnia* sp., qui a besoin de SH, chez les Haplométatrophes où nous trouvons le bacille de PFEIFFER et les Trypanosomides qui ont besoin d'hématine, c'est-à-dire de fer actif.

Nous pouvons enfin considérer les Mammifères comme des métatrophes paratrophes particulièrement exigeants : besoin de « vitamines » diverses.

CHAPITRE III

CORRÉLATIONS MORPHOLOGIQUES ET PHYSIOLOGIQUES.

Remarques sur la nutrition azotée des Eucaryotes.

Plastes, chlorophylle et synthèse des corps azotés. — Parmi les organismes que nous avons étudiés certains possèdent un plaste et de la chlorophylle et font la synthèse de leurs constituants azotés à partir de composés azotés simples : *Chlamydomonas agloëformis* et *Hæmatococcus pluvialis* à l'obscurité. D'autres possèdent un plaste, sont dépourvus de chlorophylle. Parmi eux, certains sont mésotrophes : *Polytoma uvella*, d'autres sont métatrophes : *Euglena gracilis*; d'autres possèdent des plastes et de la chlorophylle et sont métatrophes à la lumière, la photosynthèse étant obligatoire : *Euglena pisciformis*. D'autres enfin ne possèdent ni chlorophylle ni plaste et sont métatrophes : *Glaucoma piriformis*, *Strigomonas* (*Leptomonas*) *oncopelti*.

De l'examen de ces faits, nous pouvons conclure : que tous les Eucaryotes mésotrophes possèdent des plastes mais que tous les organismes possédant des plastes ne sont pas obligatoirement mésotrophes; que les organismes sans plastes sont tous métatrophes.

La mésotrophie est donc étroitement liée à l'existence des plastes, leuco ou chloroplastes, comme si, chez les Eucaryotes, le plaste était le support obligatoire des ferments qui réalisent la synthèse des acides aminés.

Le cas d'*Euglena gracilis*, qui conserve ses plastes à l'obscurité mais perd sa chlorophylle, montre que dans certains cas l'activité des ferments en question dépend de la présence ou de

l'activité de la chlorophylle. Nous avons vu que la plupart des Bactéries, des Levures et des Champignons dépourvus de plastes sont mésotrophes. La conclusion que la mésotrophie est liée au plaste et parfois à la chlorophylle est donc bien limitée aux Protistes Eucaryotes.

Cette conclusion est d'ailleurs en accord avec les données morphologiques ou plutôt histophysiologiques relatives aux plastes des plantes vertes et des chlorophytes, ainsi qu'aux conceptions physiologiques actuelles sur la nutrition azotée des métaphytes.

Données histophysiologiques. — Il y a chez les plantes vertes, pendant la photosynthèse, accumulation de réserves protéiques. Cette accumulation se fait spécialement dans les chloroplastes que l'on peut voir augmenter de volume. Une digestion pepsique réduit considérablement le volume de ces plastes hypertrophiés (ULRICH, 1924).

Le développement du leucoplaste de *Polytoma* est en rapport avec la nature de l'aliment azoté : développé au maximum lorsque l'aliment azoté est un sel d'ammonium, le plaste est très réduit dans les solutions de peptones ; d'autre part, l'aliment azoté est localisé exclusivement dans le plaste (VOLKONSKY 1930 c) ; se rapporter pour l'exposé de tous ces faits au chapitre sur *Polytoma uella* (p. 27). Il semble donc bien que, chez les organismes possédant des plastes, chloroplastes ou leucoplastes, ce sont ces plastes qui sont le siège de la synthèse des acides aminés et des premiers stades de la protéosynthèse, les protéines complexes apparaissant dans le vacuome.

Données physiologiques. — On sait que certaines plantes vertes peuvent faire des protides aux dépens des nitrates, à l'obscurité complète, si elles possèdent une réserve suffisante de sucre. Mais les nitrates sont beaucoup moins bien utilisés à l'obscurité que les sels d'ammonium. D'ailleurs toutes les plantes vertes ne possèdent pas le pouvoir de réduire les nitrates à l'obscurité. C'est ainsi que les nitrates s'accumulent dans les feuilles de betteraves maintenues à l'obscurité, alors qu'ils disparaissent à la lumière. Les nitrates sont réduits dans les feuilles vertes et non dans les feuilles dépourvues de chlorophylle. Les feuilles blanches assimilent d'ailleurs mieux l'azote ammoniacal que l'azote nitrique, comme les plantes vertes à l'obscurité. On sait aussi

que les plantes recevant une alimentation riche en nitrates assimilent le CO_2 beaucoup plus fortement que les plantes soumises au jeûne azoté. Enfin, KOSTYTSCHEW cite, à l'appui de l'hypothèse que la synthèse des protéines par les plantes vertes représente un processus photochimique direct, le fait suivant découvert par KRASHENINNIKOV : la chaleur de combustion des feuilles après une exposition à la lumière est toujours supérieure à cette valeur calculée en tenant compte de la synthèse des glucides. Fait qui s'explique si l'on admet que des protides sont formés en même temps que des hydrates de carbone.

Nous ne pouvons mieux faire que de donner ici les conclusions que l'on trouve dans les traités classiques :

« Si nous ne pouvons attribuer au pigment chlorophyllien un rôle direct dans la synthèse des matières protéiques, du moins nous constatons qu'il existe un parallélisme étroit entre la présence et l'absence de chlorophylle dans un organe donné et la nature des substances azotées qui s'y trouvent contenues » (MOLLIARD, p. 120).

« Nous avons le droit de conclure que la formation de protides aux dépens des nitrates dans les plantes vertes, au moins ses premières étapes, représente un processus photochimique » (KOSTYTSCHEW, p. 149).

Nos constatations sont en accord avec ces conclusions. Nous remarquerons que *Hæmatococcus pluvialis* et *Chlamydomonas agloëformis*, qui assimilent parfaitement les nitrates à la lumière, ne peuvent les utiliser à l'obscurité, même en présence d'une source carbonée organique favorable, et malgré la présence de chlorophylle. *Polytoma uvella* n'utilise pas non plus les nitrates.

La réduction des nitrates, chez les chlorophytes, comme chez la plupart des métaphytes, semble donc bien liée à la fonction chlorophyllienne, à la photosynthèse. La synthèse des acides aminés et des protides à partir de sels d'ammonium ou de groupements NH_3 est au contraire possible lorsqu'on supprime la fonction chlorophyllienne (*Hæmatococcus pluvialis* et *Chlamydomonas agloëformis* à l'obscurité) ou en l'absence de chlorophylle (*Polytoma uvella*).

Quant aux causes de ce parallélisme, elles sont faciles à concevoir à la lumière des résultats de travaux de WARBURG et NEGELEIN (1920). Des cellules vertes, soumises à l'action des

narcotiques, n'assimilent presque plus, mais réduisent les nitrates avec dégagement d'acide carbonique. Le carbone proviendrait d'un glucide et serait simplement un accepteur d'oxygène. La lumière qui active la réaction agit sur la molécule par photolyse.



Or, d'après la théorie de WURMSER, la réaction photochimique sensibilisée par la chlorophylle serait précisément une photolyse de l'eau $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}_2 + \text{O}_2^-$. Cette photolyse de l'eau interviendrait donc parallèlement dans la réduction du CO_2 et la réduction des nitrates, cette dernière subordonnée de plus à l'existence de carbone glucidique.

Il est des cas cependant, *Euglena deses*, *Euglena klebsii* où, à la lumière, malgré la présence de chlorophylle, l'utilisation des nitrates et même des sels d'ammonium est impossible. La nutrition azotée doit obligatoirement se faire aux dépens de corps organiques, acides aminés (H. Dusi) : photomésotrophie.

Enfin, dans le cas d'*Euglena pisciformis*, malgré la présence de chlorophylle, à la lumière, la synthèse des acides aminés est impossible. *Euglena pisciformis* présente les mêmes besoins que *Glaucoma piriformis* et la lumière lui est indispensable : photométatrophie (H. Dusi).

De tout ce qui précède, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

Chez les chlorophytes, la possibilité de réduire les nitrates est en général liée à la photosynthèse. La synthèse des composés azotés se fait dans les plastes. Dans certains cas, l'activité des ferments, responsable de la synthèse des substances protidiques, activité conditionnant la « mésotrophie », est indépendante de la fonction chlorophyllienne et même de la présence de chlorophylle (oxymésotrophie). Dans d'autres cas, cette activité est liée à la chlorophylle, disparaissant et reparaissant avec cette dernière : autotrophie à la lumière, métatrophie à l'obscurité.

Enfin, des organismes à chlorophylle peuvent, à la lumière, avoir besoin de corps azotés organiques simples ou complexes.

Remarques sur la nutrition carbonée.

L'étude comparative de la nutrition azotée nous a montré des différences très marquées du pouvoir de synthèse entre le type mésotrophe et le type métatrophe. L'étude comparative de la nutrition carbonée va nous montrer des différences non moins importantes d'un tout autre ordre.

Pour certains organismes, la présence d'une source carbonée indépendante est indispensable. Elle ne l'est pas pour d'autres. *Polytoma uvella*, quelle que soit la source azotée, acide aminé ou peptone, a besoin d'un acide organique, acide acétique ou butyrique. C'est également le cas d'*Euglena gracilis* pour qui les acides acétique, propionique, butyrique, valérianique et caproïque peuvent servir d'aliment carboné.

COMPARAISON ENTRE LA NUTRITION CARBONÉE
DE *Polytoma uvella* ET *Euglena gracilis*.

	<i>Polytoma uvella</i>	<i>Euglena gracilis</i>
Acide acétique	++	++
» propionique	o	+
» butyrique normal.	++	++
» isobutyrique	o	o
» valérianique normal	o	+
» caproïque normal.	o	++
» diéthylacétique.	o	o
» heptylique normal.	o	o
» octylique normal	o	o
» nonylique normal.	o	o

Nous avons montré que *Hæmatococcus pluvialis* et *Chlamydomonas agloëformis* peuvent se multiplier en l'absence d'une source carbonée indépendante, mais que l'addition d'acides organiques au milieu (acétique ou butyrique) améliore cependant considérablement le développement. Dans la même catégorie des organismes n'ayant pas besoin d'une source carbonée indépendante, nous trouvons *Glaucoma piriformis*, *Strigomonas oncopelti* et tous les Trypanosomides. Deux remarques s'imposent dès maintenant :

1° Il n'y a pas de relation entre le pouvoir de synthèse azoté et la nécessité de l'aliment carboné organique : *Polytoma uvella*, mésotrophe, et *Euglena gracilis*, métatrophe, ont tous deux besoin d'une source carbonée organique, état que nous traduisons par le terme d'oxytrophie.

Nous dirons donc que *Polytoma uvella* est oxymésotrophe et *Euglena gracilis*, oxyhétérotrophe.

Au contraire, à *Chlamydomonas agloëformis* et *Hæmatococcus pluvialis* (mésotrophes), et *Glaucoma piriformis* et aux Trypanosomides, une source carbonée indépendante n'est pas nécessaire, le carbone étant fourni par les corps azotés organiques. Aux premiers, nous réservons le nom de Haplomésotrophes, aux seconds celui de Haplométatrophes.

Chez les Bactéries, les Levures et les Champignons, si l'aliment azoté est un acide aminé convenablement choisi ou à plus forte raison une peptone, la présence d'un acide organique ou d'un glucide n'est jamais nécessaire : haplotrophie opposée à l'oxytrophie.

2° L'oxytrophie des Protozoaires, définie par son caractère obligatoire est différente de celles des Bactéries, contingente et liée à la nature de l'aliment azoté. *Euglena gracilis* est oxymétatrophe, *Polytoma uvella* est oxymésotrophe, mais peut se nourrir également de polypeptides complexes. Mais, même lorsqu'on lui fournit une peptone complète, suffisante pour les métatrophes, la présence d'un aliment carboné indépendant est indispensable. Enfin, seuls certains acides organiques peuvent servir de source carbonée : ce sont les termes inférieurs de la série des acides gras, ne renfermant pas plus de 4 (*Polytoma*), ou de 6 (*Euglena gracilis*) atomes de carbone dans leur molécule. Nous avons montré d'autre part, que la possibilité de leur utilisation est liée pour *Polytoma* à l'existence d'un nombre pair de groupements CH_2 ; et que pour *Euglena gracilis*, les acides à nombre pair sont plus favorables que les acides à nombre impair de groupement CH_2 . Les isomères à chaîne bifurquée ne sont pas utilisables.

Aucun des acides des autres séries essayées ne peut remplacer les acides gras inférieurs. Il faut mettre ici en relief que les Bactéries, les Levures et les Champignons utilisent les acides appartenant aux séries les plus diverses.

Nous avons établi la relation entre la mésotrophie et les plastes. Nous allons essayer de définir les facteurs conditionnant l'oxytrophie, c'est-à-dire le mode de nutrition caractérisé par la nécessité d'une source carbonée indépendante. Nous allons montrer que cette oxytrophie est déterminée par deux facteurs : 1° la présence d'une plaste, et 2° l'absence de chlorophylle.

Le type du leucophyte oxytrophe est *Polytoma uvella* qui est oxymésotrophe (voir p. 98). *Polytoma uvella* possède un plaste (leucoplaste) et des réserves glucidiques figurées (grains d'amidon). Il est dépourvu de chlorophylle. *Chlamydomonas agloëformis* et *Hæmatococcus pluvialis* qui possèdent un plaste et conservent leur chlorophylle à l'obscurité sont haplomésotrophes : une source carbonée indépendante ne leur est pas indispensable. La race physiologique stable d'*Euglena gracilis* à l'obscurité est oxytrophe (oxymétatrophe). Elle est dépourvue de chlorophylle mais possède des leucoplastes et des réserves glucidiques figurées : paramylon.

A *Glaucoma piriformis*, *Strigomonas* (*Leptomonas*) *oncopelti* et à tous les Trypanosomides, une source carbonée organique indépendante n'est pas nécessaire : métatrophie s. s.

Donc, *Polytoma uvella* et *Euglena gracilis* (race physiologique stable à l'obscurité) qui possèdent un plaste et pas de chlorophylle sont oxytrophes. *Chlamydomonas* et *Hæmatococcus* qui possèdent un plaste et de la chlorophylle sont haplomésotrophes. *Glaucoma piriformis* et *Strigomonas oncopelti* qui ne possèdent pas de plastes sont haplométatrophes.

Nous admettons par conséquent que le plaste n'est pas un organe indispensable, puisque les Protozoaires en sont dépourvus. Mais la présence et le fonctionnement du plaste impriment à l'organisme qui le possède une physiologie particulière. C'est ainsi que les Protistes eucaryotes qui ont des plastes font la synthèse des réserves glucidiques figurées. Certaines fonctions indispensables à la vie cellulaire appartiennent au plaste et sont liées à son fonctionnement. C'est pourquoi les organismes dépourvus de plaste ne peuvent se satisfaire des solutions peptonnées suffisantes aux métatrophes. Il faut leur fournir un acide organique — un acide gras simple — dont le plus favorable est l'acide acétique que l'on doit considérer comme l'aliment électif du plaste.

Les Levures, les Champignons, les Bactéries et les Protozoaires, dépourvus de plastes, n'ont pas besoin d'acides gras.

Or, fait très remarquable, *Chlamydomonas agloëformis* et *Hæmatococcus pluvialis*, pourvus tous deux d'un plaste et de chlorophylle, n'ont pas besoin d'acides gras. On nous objectera le cas d'*Euglena gracilis* qui, pendant les premiers mois de sa vie à l'obscurité, peut se passer d'acides gras. Mais on peut précisément se demander — et il est très logique de le supposer — si de très petites quantités de chlorophylle ne persistent pas pendant les premiers temps de vie sans lumière et si ce n'est pas grâce à cette chlorophylle qu'est réalisée la synthèse des acides gras, ce qui ramène le cas d'*Euglena gracilis*, pour un temps au moins, à celui de *Chlamydomonas* et *Hæmatococcus*. La persistance de la chlorophylle pendant les premiers mois de vie à l'obscurité est en tous cas hors de doute, et c'est ce qui explique que tous les auteurs qui n'ont pas poursuivi assez longtemps leurs expériences aient obtenu des cultures d'*Euglena gracilis* à l'obscurité en milieu peptoné (ZUMSTEIN, TERNETZ, PRINGSHEIM, MAINX). Ainsi que l'ont montré LWOFF et DUSI (1931), l'oxytrophie n'apparaît qu'au bout de plusieurs mois (voir p. 88), lorsque, probablement, il ne persiste plus que des traces infimes de chlorophylle. Le cas d'*Euglena gracilis* vient donc à l'appui de notre manière de considérer l'oxytrophie comme liée à la présence d'un plaste et à l'absence de chlorophylle.

D'ailleurs nous avons vu qu'aucun des organismes qui possèdent des plastes et qui conservent leur chlorophylle à l'obscurité, certains Métaphytes, les Algues vertes : *Stichococcus*, *Chlorella*, *Scenedesmus*, etc., ne se montrent oxytrophes.

L'oxytrophie est donc bien liée à la présence du plaste et à l'absence de chlorophylle.

Remarques sur les acides gras. — Chez les plantes vertes, les acides gras inférieurs sont considérés comme intermédiaires entre les substances glucidiques et lipidiques. C'est ainsi que pendant les premières phases du développement des graines oléagineuses, on trouve des acides gras libres et « il semble donc bien qu'il se constitue d'abord des acides gras aux dépens des sucres et que l'éthérification ne se produit qu'ensuite » (MOLLIARD). De même, au cours de la germination, l'huile des réserves oléagineuses des graines est décomposée et donne des

acides gras inférieurs. Il se produit ensuite des substances glucidiques, saccharose, sucres réducteurs, amidon, cellulose, substances qu'on peut considérer comme formées à partir des acides gras. VON EULER a d'ailleurs admis que la synthèse des acides gras commence par l'aldocondensation de deux molécules d'aldéhyde acétique. D'autre part, cette même aldocondensation conduit à des glucides réducteurs.

Donc, les acides gras inférieurs (solubles dans l'eau et dans les lipoides) constitueraient le terme de passage entre les lipides et les glucides. Il existe d'ailleurs chez *Polytoma uvella* un balancement entre les réserves ternaïres : glucides et graisses. Dans les cultures jeunes, en milieu à l'acétate d'ammonium, il y a très peu de graisses. Ce sont des graisses normales, peu réductrices qui se forment dans le cytoplasme. La presque totalité des réserves est constituée par des grains d'amidon. Dans les cultures âgées, la quantité d'amidon diminue et il apparaît dans le plaste un grand nombre de gouttelettes de graisse très réductrice, graisse de réserve (VOLKONSKY, 1930). Enfin, la qualité de l'aliment ternaïre a une influence sur la nature des réserves. Dans les cultures où l'aliment carboné est l'acide acétique, il y a beaucoup d'amidon et peu de réserves protéiques (1). Si l'on remplace l'acide acétique par de l'acide butyrique moins facilement assimilable, les réserves protéiques sont plus abondantes et l'amidon est en quantité très restreinte (VOLKONSKY). Il est donc certain que l'acide acétique ou ses dérivés immédiats (aldéhyde acétique) interviennent par l'intermédiaire du plaste de façon directe dans l'élaboration des réserves lipidiques et glucidiques.

Le fait que les organismes *Chlamydomonas agloëformis* et

(1) KEDROVSKY constate un phénomène analogue (balancement entre la protéosynthèse et la liposynthèse) chez *Opalina ranarum* et en propose l'explication suivante : les deux phénomènes seraient des phénomènes de synthèse par action d'interface (Grenzflächsynthesen), régis par la loi de Gibbs-Thomson d'adsorption aux interfaces des corps abaissant la tension superficielle. Les acides gras et les polypeptides entrant en concurrence pour la fixation sur les différentes interfaces intracellulaires, on conçoit que la lipo- et la protéosynthèse puissent être, dans certaines conditions, complémentaires (voir KEDROVSKY, *Zeit. f. Zellf. u. Mikr. Anat.*, t. XIII, 1931, p. 1).

Hæmatococcus pluvialis, *Euglena gracilis* nouvellement placée à l'obscurité qui possèdent de la chlorophylle peuvent se passer d'acides gras, nous incite à conclure que la chlorophylle tient sous sa dépendance la synthèse de l'acide acétique.

Les acides gras inférieurs seraient indispensables au métabolisme des organismes en question. D'autre part, ces mêmes acides gras inférieurs (acétique et butyrique) et eux seuls provoquent en effet un accroissement de la multiplication de *Chlamydomonas agloëformis* et d'*Hæmatococcus pluvialis* à l'obscurité. Par ailleurs, *Euglena gracilis*, après quelques mois de vie à l'obscurité, acquiert le besoin d'acides gras. C'est donc bien la chlorophylle qui supplée, à l'obscurité à la carence du milieu en acides gras. Or, d'après STERN (1921) la chlorophylle du chloroplaste serait dissoute dans une phase lipoïdique distribuée dans une solution protéique et on admet, précisément, la chlorophylle étant insoluble dans l'eau, que certaines réactions de la photosynthèse doivent se faire dans une phase, d'autres dans l'autre phase.

La chlorophylle prend une part directe aux réactions qui aboutissent à la réduction du CO_2 , réduction qui aboutit ainsi qu'il est très généralement admis aujourd'hui à la formation d'aldéhyde ou d'acide formique. Les organismes à chlorophylle construiraient ainsi leurs glucides et leurs lipides à partir du groupement COOH formé à la lumière grâce à la photosynthèse.

À l'obscurité, cette synthèse des glucides et des lipides par les chlorophytes serait faite aux dépens des groupements carbonés des acides aminés, ou des acides organiques. Le fait que les leucophytes, par définition dépourvus de chlorophylle, ont besoin d'un acide gras inférieur, nous amène à la conclusion que la synthèse des lipides et des glucides à partir du groupement COOH a pour étape intermédiaire un acide gras inférieur, probablement l'acide acétique. Le fait aussi que les organismes à chlorophylle peuvent, à l'obscurité, se passer d'acides gras, nous conduit à émettre l'hypothèse que la chlorophylle possède une autre fonction que la photosynthèse. La condensation qui doit amener l'acide ou l'aldéhyde formique à l'état d'acide acétique dépend en effet de la présence de chlorophylle et peut se faire en l'absence de lumière. Quant à la synthèse des glucides figurés, de poids moléculaire élevé, elle est une fonction du plaste et peut se

faire en l'absence de lumière et de pigment chlorophyllien à partir des acides gras inférieurs. Toutes ces considérations sont évidemment quelque peu théoriques. Du moins n'avons-nous fait que conduire à son terme logique l'interprétation de quelques faits.

L'hypothèse de l'acide acétique envisagé comme terme secondaire de l'assimilation chlorophyllienne et comme aliment électif du plaste est en accord avec les conceptions biochimiques actuelles et c'est la seule qui permette de relier les données physiologiques et morphologiques.

Définition physiologique des Chlorophytes et des Protozoaires.

Nous avons arbitrairement divisé les Protistes eucaryotes possédant un noyau défini en Chlorophytes qui possèdent un plaste et en Protozoaires qui n'en possèdent pas. Nous allons essayer de définir physiologiquement ces deux groupes.

Nutrition azotée. — L'étude de la nutrition azotée nous a montré que la photoautotrophie est la condition physiologique générale des Eucaryotes à chlorophylle, que la mésotrophie est l'une des conditions des Leucophytes et des Chlorophytes cultivés à l'obscurité, mais peut également se rencontrer chez les phototrophes (photomésotrophie). Enfin, que la métatrophie, condition des Protozoaires, peut se rencontrer également chez les Chlorophytes.

Il y a donc impossibilité à définir physiologiquement les Chlorophytes et les Protozoaires par les caractères de leur nutrition azotée. Tout ce qu'il est possible de dire, c'est que la grande majorité des Chlorophytes sont autotrophes et que, probablement, sont mésotrophes la majorité des Leucophytes ou des Chlorophytes privés de la fonction chlorophyllienne.

Nutrition carbonée. — Les Chlorophytes sont phototrophes, c'est-à-dire assimilent le carbone du CO_2 atmosphérique grâce à l'énergie lumineuse fixé par la chlorophylle.

Les Leucophytes sont oxytrophes, c'est-à-dire ont besoin d'une source carbonée organique indépendante qui, jusqu'à maintenant, s'est toujours montrée devoir être un acide gras inférieur.

Les Protozoaires sont tous haplotrophes c'est-à-dire peuvent se passer d'aliment carboné organique indépendant, mais les Chlorophytes, cultivés à l'obscurité et qui conservent leur chlorophylle, sont également haplotrophes.

Il est donc impossible de définir physiologiquement les Chlorophytes privés de la fonction chlorophyllienne et les Protozoaires par les caractères de leur nutrition carbonée.

Par contre, la nutrition carbonée des Leucophytes est nettement différente de celle des Protozoaires et des Bactéries, Levures et Champignons. Les Leucophytes sont obligatoirement oxytrophes, les Protozoaires sont haplotrophes. Le caractère morphologique qui nous a permis de séparer les Chlorophytes des Protozoaires, la présence ou l'absence du plaste, permet donc en outre une définition physiologique de chacun de ces deux mêmes groupes, définition générale pour les Protozoaires : organismes haplotrophes; définition générale pour les Leucophytes : organismes oxytrophes, et définition pour les Chlorophytes dans les conditions où sont réalisées les synthèses maxima, c'est-à-dire à la lumière : organismes phototrophes.

Mais si nous considérons les Protistes eucaryotes dans les conditions maxima de synthèse nous pouvons dire :

- 1° Que les Chlorophytes sont phototrophes ;
- 2° Que les Leucophytes sont oxytrophes ;
- 3° Que les Protozoaires sont haplotrophes (et métatrophes).

Nous avons ainsi réussi à donner, pour la première fois croyons-nous, des diagnoses physiologiques différentielles des protistes eucaryotes animaux : Protozoaires, et des Protistes eucaryotes végétaux : Chlorophytes et Leucophytes.

Peut-être trouverait-on dans les caractères des produits d'excrétion, produits de l'oxydation des acides aminés, des caractères distinctifs importants. Il est dès maintenant classique que les animaux excrètent continuellement de l'azote alors qu'il n'y a pas d'excrétion azotée continue chez les Plantes. L'étude de la comparaison de l'excrétion chez les Protozoaires, les Chlorophytes et les Leucophytes fournira à cet égard des renseignements précieux, en particulier sur le rôle des plastes dans les transformations des produits d'oxydation des corps azotés. Nous nous bornons ici à l'étude du pouvoir de synthèse. Nos recherches en cours sur l'excrétion seront exposées ultérieurement.

CHAPITRE IV

L'ÉVOLUTION MORPHOLOGIQUE ET PHYSIOLOGIQUE DES PROTISTES EUCARYOTES

Arguments physiologiques.

Les Protistologues ont longtemps considéré les Amibes comme les organismes les plus simples donc les plus primitifs et en ont fait la souche des animaux.

Cette conception est actuellement complètement abandonnée à la suite des travaux qui ont montré que les flagellés à pigment assimilateur devaient être considérés comme les ancêtres des Protozoaires. Cette dernière conception repose sur des considérations physiologiques et morphologiques et sur des données expérimentales qui seront examinées ultérieurement.

SACHS (1882) et BERGH (1882) ont les premiers introduit dans la discussion phylogénique l'argument de la subordination nutritive que l'on peut résumer ainsi : les organismes à chlorophylle possédant seuls le pouvoir de se nourrir de substances minérales, et en particulier d'assimiler le carbone atmosphérique, les organismes sans chlorophylle, qui utilisent de la substance organique préformée, dépendent donc de l'existence d'organismes autotrophes, n'ont donc pu apparaître qu'après ceux-ci, en dérivent.

Or, il existe des bactéries qui assimilent le carbone du CO_2 , d'autres qui fixent l'azote atmosphérique. Il existe d'autre part dans le sol des bactéries dont la nutrition est liée à des oxydations, en général très spécifiques. Mais les bactéries de la terre forment suivant l'heureuse expression de WINOGRADSKY (1931) un « collectif organisé ». L'existence de ce collectif, de par le nombre et la variété des espèces qui le constituent, suffit à

assurer, au moins qualitativement le cycle des substances carbonées et azotées nécessaires à la synthèse de la matière vivante par les organismes hétérotrophes.

Et JENSEN (1909) a en effet envisagé les Bactéries comme la souche des plantes et des animaux. Il considère les bactéries chimiotrophes comme les premiers êtres vivants et émet l'hypothèse qu'au moment de l'apparition sur la terre des premiers organismes, il devait exister, par suite de la température élevée, une atmosphère de vapeur d'eau empêchant l'assimilation chlorophyllienne. Il fait remarquer que les Bactéries ont pu servir de nourriture aux Protozoaires et assurer ainsi, par leur intermédiaire, la nutrition des Echinodermes, Crustacés, larves d'Insectes, etc.

Mais l'argument de la subordination nutritiale forme encore le point de départ de beaucoup d'exposés relatifs à la phylogénie des Protistes. C'est ainsi que KNIEP (1912) considère que ce sont les organismes autotrophes à chlorophylle qui sont d'abord apparus sur la terre et que c'est parmi eux que l'on doit rechercher les ancêtres de tous les êtres vivants. REICHENOW (1929) écrit : « Si nous envisageons les Protozoaires du point de vue de leur métabolisme, il apparaît clairement que les formes les plus proches des organismes apparus les premiers sont les formes dont la nutrition ne dépend que de corps inorganiques ; car ce sont les organismes autotrophes qui ont donné aux hétérotrophes la possibilité de vie ».

Nous avons vu que l'existence des Flagellés autotrophes ne peut être considérée comme une condition *sine qua non* de l'existence des Protozoaires, dont beaucoup, actuellement, se nourrissent effectivement de Bactéries. Nous pouvons donc dire que le fait que les Protozoaires ont besoin de substances organiques ne peut pas entraîner automatiquement la conclusion qu'ils dérivent des Chlorophytes.

L'argument de la subordination nutritiale, puisqu'il n'a pas de valeur absolue, doit donc être catégoriquement rejeté des discussions phylogéniques.

Nous allons voir que les données morphologiques et surtout les faits expérimentaux suffisent à eux seuls à établir sur des bases solides la descendance des Protozoaires à partir des chlorophytes.

Les faits morphologiques.

Il existe dans tous les ordres de chlorophytes — comprenant une majorité de formes à chlorophylle — des espèces ou des variétés incolores, mais dont la forme, le cycle évolutif, la structure, l'organisation sont identiques à ceux des organismes colorés. Il existe en un mot des organismes qui ne diffèrent que par la présence ou l'absence de chlorophylle.

C'est ainsi que parmi les Cryptomonadines, les *Cryptomonas* à pigment assimilateur ont une réplique incolore, les *Chilomonas*. Dans l'ordre des Phytomonadines, nous trouvons dans la famille des *Polyblepharidæ*, à côté des *Pyramidomonas* verts, les *Polytomella*, incolores; dans la famille des *Chlamydomonadineæ*, appartenant au même ordre, à côté des *Chlamydomonas* verts, les *Polytoma* incolores, à côté des *Chlorogonium* verts, les *Hyalogonium* incolores.

Certaines espèces d'Euglènes sont toujours vertes, d'autres toujours incolores. Enfin certaines formes ne doivent être considérées que comme des variétés incolores d'espèces à chlorophylle. Parmi les Dinoflagellés, dans la famille des *Gymnodinoidæ*, on connaît des formes à pigment assimilateur, d'autres qui en sont dépourvues. Dans le genre *Polykrikos*, Péridinien tétraénergide dont l'origine monophylétique ne saurait être mise en doute, nous trouvons des espèces dont l'une, *Polykrikos lebouri*, possède de la chlorophylle et l'autre *Polykrikos schwartzi* en est dépourvu. Les Péridiniens parasites sont tous dépourvus de pigment à l'exception de *Schizodinium* et de *Blastodinium* (CHATTON).

Blastodinium spinulosum peut présenter tous les degrés de pigmentations et des formes incolores.

Blastodinium contortum hyalinum est toujours incolore.

Nous n'avons parlé jusqu'ici que du pigment, pour envisager séparément le cas du plaste. Parmi les formes incolores, ayant des équivalents morphologiques colorés, certaines possèdent un plaste, d'autres en sont dépourvues. Il faut s'entourer de beaucoup de garanties avant d'affirmer qu'un organisme est dépourvu de plaste. Nous n'en voulons pour preuve que le cas de *Polytoma uvella* chez lequel l'existence d'un plaste a été longtemps

méconnue. En principe, on doit soupçonner l'existence d'un leucoplaste chez toutes les espèces capables de former de l'amidon, ou du paramylon. C'est pourquoi nous ne retiendrons provisoirement comme espèces certainement dépourvues de leucoplaste que celles où le plaste a été recherché en vain et où il n'existe pas de réserves glucidiques figurées.

Parmi les espèces sans chlorophylle possédant un plaste on peut citer les *Polytoma*, les Euglènes incolores. Parmi les espèces dépourvues de chlorophylle et de plaste nous trouvons certaines variétés de *Blastodinium spinulosum* et d'autres organismes correspondant à des espèces présentant un leucoplaste ou un chloroplaste : la variété *hyalinum* de *Blastodinium contortum*. L'absence de plaste chez les *Blastodinium* se traduit par un aspect très particulier du cytoplasme et entraîne l'absence de réserves amylacées (E. CHATTON 1920).

On peut aussi considérer la *Tussetia* de PASCHER comme un *Chlamydomonas* sans plaste.

Enfin, chez certains Flagellés, le plaste est en régression : chez *Chlamydomonas viridemaculata*, le chromatophore est une petite plaquette vert pâle (PASCHER) ; chez *Poteriochromonas*, il y a un très petit chromatophore et parfois même pas de chromatophore du tout. Quant à *Rhizochrysis scherffeli*, que nous allons retrouver au paragraphe suivant, il a en général un plaste mais peut en être dépourvu de même que *Chrysarachnion*. Enfin, la Chrysomonadine incolore *Heterolagynion*, possède un équivalent morphologique pigmenté *Lagynion*. On peut encore considérer avec certitude comme des Chrysomonadines sans plaste, les *Leucochrysis* qui possèdent l'enveloppe kystique caractéristique de ce groupe.

Donc à des formes à pigment assimilateur correspondent des formes qui en diffèrent, soit par l'absence de chlorophylle, soit par l'absence de chlorophylle et de plaste. Les Chrysomonadines, bien connues depuis les travaux de SCHERFFEL (1927) et de PASCHER (1916 à 1925), montrent en particulier une belle série d'intermédiaires entre les Flagellés pigmentés et les Rhizopodes incolores. Et c'est l'étude des Chrysomonadines qui a conduit PASCHER à admettre la dérivation des Rhizopodes à partir des Flagellés à pigment, conception actuellement admise par tous les protistologues (voir DOFLEIN-REICHENOW, 1929).

Mais toutes ces données sont des faits statiques d'où l'on ne peut tirer qu'une seule conclusion, c'est que des groupes très homogènes, renfermant des Chlorophytes et des Protozoaires, sont d'origine monophylétique.

Nous allons exposer les faits qui permettent d'établir le sens de leur évolution.

Données dynamiques et expérimentales.

Ces faits sont de deux ordres : ceux relatifs au plaste et ceux relatifs au pigment.

1° *Données relatives au plaste.* — Quelques considérations sur le plaste sont ici nécessaires. Le plaste et les mitochondries présentent d'indiscutables caractères de parenté histochimique et on admet généralement que les plastes sont des mitochondries spécialisées ou que plastes et mitochondries ont une origine commune. Mais quel que soit le degré de parenté de ces organites, un fait est incontestable, c'est la spécialisation actuelle du plaste. Les plastes se reproduisent par division et on peut dire que tout plaste naît d'un plaste préexistant. Il y a évidemment des cas où la continuité génétique des plastes est difficile à suivre comme dans certaines graines où le pigment chlorophyllien disparaît et où le plaste ressemble alors tout à fait à une mitochondrie. Quelques auteurs n'ont pas manqué de soutenir que des mitochondries peuvent donner naissance à des plastes, alors que d'autres pensent au contraire que le plaste sans pigment, quoique indifférenciable morphologiquement des mitochondries, conserve néanmoins son individualité. C'est à cette dernière conception que nous nous rangeons. Et il est de fait que chez les Algues en particulier, la continuité génétique des plastes est facile à suivre, indiscutable et d'ailleurs indiscutée.

Cette continuité génétique existe également chez les Chlorophytes où l'on a toujours vu les plastes se multiplier par division et où on n'a jamais signalé leur néoformation. Or, si le plaste n'est pas néoformé, il peut au contraire disparaître.

La Chrysomonadine *Rhischrysis scherffeli* possède un seul plaste, non réticulé, massif. Normalement, le plaste se divise avant la plasmotomie et chaque individu-fils emporte un plaste-fils.

Mais dans certains cas, le plaste ne se divise pas et il est alors tout entier emporté par l'un seulement des individus-fils, l'autre en étant naturellement dépourvu (SCHERFFEL, confirmé par DOFLEIN). *Nous assistons ici à la genèse d'un organisme sans plaste à partir d'un organisme qui en est pourvu* et PASCHER a pu observer la multiplication de telles formes incolores en culture.

Mais ces organismes sans plastes sont relativement fragiles et PASCHER considère que la disparition brusque du plaste par absence de division a moins d'importance pour l'origine des Protozoaires que la régression progressive du plaste. Il existe en effet, nous l'avons vu, des Chlorophytes ayant un plaste très petit et contenant très peu de pigment. On n'a jamais vu cependant d'organismes incolores naître à partir de ces Chlorophytes à plaste régressé. Nous attachons une grande valeur démonstrative à l'observation de SCHERFFEL. Enfin, ZUMSTEIN (1899) a observé l'arrêt de la division des plastes chez *Euglena gracilis* cultivée à la lumière en milieu organique, arrêt aboutissant à la création de formes incolores définitivement dépourvues de plastes.

Cas du stigma. — Dans les anthérozoïdes des Algues, le stigma n'est souvent qu'une partie d'un chloroplaste chargé de carotène. Dans certains cas, c'est un plaste entier qui se transforme en stigma. Le stigma n'est alors qu'un organite transitoire, présent seulement dans la forme flagellée. Mais chez beaucoup de Chlorophytes le stigma est un organite permanent qui se reproduit par bipartition. La majorité des Chlorophytes possèdent un stigma. Chez les Leucophytes certaines espèces en possèdent, d'autres en sont dépourvues.

On peut rencontrer également un stigma chez les formes dépourvues de plaste, par exemple certaines espèces d'*Astasia* en possèdent, d'autres non. Enfin, PASCHER a récemment (1930) fait connaître une curieuse Amibe, *Amæba stigmatica*, qui possède un magnifique stigma.

Le stigma étant un dérivé d'un plaste ou un plaste spécialisé, comme les plastes il se reproduit toujours par bipartition. Nous pouvons donc considérer l'existence du stigma comme un caractère primitif. Dans certains cas, le stigma est la seule preuve que l'organisme qui le possède a eu pour ancêtre un organisme à pigment assimilateur.

Faits relatifs au pigment. — On n'a jamais réussi, sans supprimer les plastes, à priver définitivement un chlorophyte du pouvoir de faire la synthèse de la chlorophylle. Mais un certain nombre d'observations et d'expériences permettent cependant de conclure que les Leucophytes dérivent des Chlorophytes.

a) *Décoloration expérimentale des Euglènes.* — *Euglena gracilis* cultivée à l'obscurité ne forme plus de chlorophylle, devient blanche. Les plastes continuent cependant à se multiplier (TERNETZ). Mais reportée à la lumière, les Euglènes blanches se recolorent rapidement. Cette recoloration se produit même après trois ans de vie à l'obscurité.

b) *Décoloration définitive des Leucophytes.* — D'autre part, les Leucophytes que l'on rencontre dans la nature sont définitivement décolorés. Par exemple *Polytoma uwelli* entretenue en culture pure ne forme jamais de chlorophylle.

c) *Perte du pouvoir de former de la carotène.* — Dans tous les cas, que nous avons vu être primitifs, où le stigma n'est qu'une partie d'un chloroplaste, ce stigma forme de la carotène. Un certain nombre de Leucophytes ont un stigma rouge, d'autres ont un stigma incolore. Comme la possibilité de former de la carotène est un caractère primitif, nous devons en conclure que les stigmas incolores sont des stigmas ayant perdu le pouvoir de faire la synthèse de la carotène.

Il est donc possible d'observer la formation d'organismes dépourvus de plastes à partir d'organismes qui en sont pourvus. L'arrêt de la division des plastes peut être provoqué expérimentalement. L'absence du pouvoir de former du pigment, chlorophylle ou carotène, est un caractère secondaire du plaste.

Si l'on considère un groupe monophylétique renfermant des Chlorophytes et des Protozoaires, on peut dire que les organismes dépourvus de pigment et ceux dépourvus de plaste (et de pigment) dérivent d'organismes pourvus de plastes et de pigment. En un mot l'évolution s'est faite dans le sens Chlorophytes → Leucophytes → Protozoaires.

Les facteurs de l'évolution morphologique.

Le fait que les chlorophytes comme les métaphytes peuvent absorber des substances organiques carbonées ou azotées dissoutes est connu depuis longtemps. D'autre part, on sait maintenant qu'il existe des Chlorophytes capables de phagocytose. On trouve par exemple, des Cryptomonadines et des Chrysomonadines qui phagocytent des Diatomées, des Algues, des Levures, des Bactéries (PASCHER). Il est évident qu'un Chlorophyte qui perd sa chlorophylle ou ses plastes ne peut survivre que s'il est capable de se nourrir de substances organiques préformées. Mais l'expérience de ZUMSTEIN, — arrêt de la division du plaste par culture en milieu organique (voir p. 92) — permet de considérer que la nutrition organique est la cause de la transformation des Chlorophytes en Protozoaire dont nous avons donné l'exemple particulièrement saisissant du *Blastodinium* (d'après CHATTON). On doit donc considérer que l'arrêt de la division des plastes et la suppression de la formation du pigment sont causés par des facteurs externes. Mais ces facteurs ne peuvent agir que s'ils trouvent dans l'organisme une constitution déterminée.

Par exemple, la nutrition peptonée n'arrête la division des plastes que chez une seule variété d'*Euglena gracilis*. Certaines variétés de *Blastodinium* vivant dans des conditions identiques, conservent leur plaste et leur pigment, d'autres perdent leur pigment, d'autres enfin perdent plaste et pigment.

Les organismes réagissent donc à des facteurs identiques suivant leur constitution individuelle. On peut d'ailleurs parfaitement admettre que cette fragilité du plaste qui se traduit par l'arrêt brusque de sa division sous l'influence de la nutrition organique est une modification lente survenue elle-même sous l'influence d'une nutrition organique prolongée. Mais nous devons faire intervenir aussi dans les variations des Chlorophytes la constitution génotypique.

On sait, par exemple, que certaines variétés de la Gueule de Lion, *Anthirrinum majus*, sont vert pâle (var. *aurea* de BAUR), la couleur normale étant le vert franc. Or, l'analyse mendélienne a montré que les individus constituant la variété *aurea* sont des hétérozygotes. Le croisement *aurea-aurea* donne en

effet trois types de descendants, dont $1/4$ sont vert pur, $2/4$ sont *aurea* et $1/4$ sont jaune pur, c'est-à-dire complètement dépourvus de chlorophylle. Ces jaunes purs, qui ne possèdent pas la fonction chlorophyllienne ne se développent jamais dans les conditions naturelles. La plupart meurent avant la germination, les autres pendant la germination. On peut cependant les conserver par greffage sur des individus à chlorophylle.

Les hybrides *aurea* renferment deux facteurs allélomorphes AUR et aur, AUR permettant la synthèse de la chlorophylle, aur ne la permettant pas. Les produits du croisement renfermant AUR-AUR sont vert pur ; ceux qui renferment AUR-aur sont *aurea*, ceux qui contiennent aur-aur sont jaune pur.

On doit envisager que l'impossibilité de former de la chlorophylle chez les chlorophytes peut être liée à leur constitution génotypique et que les phénomènes sexuels peuvent intervenir dans la réalisation des leucophytes.

Mais quelles que soient les causes des modifications observées, on est amené à admettre l'existence chez les Chlorophytes de séries évolutives caractérisées par la tendance à la disparition des organes responsables de la fonction chlorophyllienne. Nous devons remarquer que c'est là une tendance propre à certains chlorophytes, car PASCHER a montré l'existence d'une série de formes qui conduisent des Chrysomonadines, par l'intermédiaire des formes coloniales, aux Algues pluricellulaires.

Par ailleurs, cette évolution, si l'on considère séparément le chloroplaste et le carotinoplaste (stigma), est parfois hétérochronique, ainsi que PASCHER l'a fait remarquer (1930). Enfin, les organites cellulaires autres que le plaste peuvent subir eux-mêmes des évolutions variées. Par exemple, on peut considérer que chez les Péridiniens, il y a, en même temps que régression du plaste, hyperactivité du centrosome.

Polykrikos lebouri possède un plaste et pas de cnidocystes ; *Polykrikos schwartzi* est dépourvu de plastes mais possède des cnidocystes. Les *Syndinium* dépourvus de plastes renferment des trichites (CHATTON, 1920). Or, cnidocystes (CHATTON, 1914) et trichites (E. CHATTON, A. et M. LWOFF, 1931) sont des dérivés centrosomiens. Nous trouvons aussi des exemples de multiplication du centrosome et des flagelles chez les Euglènes parasites.

Mais chez certains Rhizopodes il y a, au contraire disparition du

centrosome, probablement par retard de la division. Cette disparition est définitive comme celle du plaste puisque, chez les Protozoaires, le centrosome est doué de continuité génétique (E. CHATTON, A. et M. LWOFF, 1931).

Nous nous sommes permis cette digression pour éviter au lecteur la tentation d'établir un rapport entre les facteurs qui, provoquent la régression et la disparition du plaste et du pigment, et les fonctions mêmes du plaste et du pigment. La nutrition organique agit, par exemple, sur le centrosome qui ne joue probablement aucun rôle dans les phénomènes trophiques, et le fait que la disparition du plaste entraîne des besoins alimentaires organiques nouveaux ne doit pas être relié au fait que cette disparition a eu lieu sous l'influence d'une nourriture organique.

Les conclusions de ce chapitre n'ont en aucune façon la prétention d'être originales. Nous avons cru bon cependant de présenter les faits d'une manière un peu différente de celle de nos prédécesseurs en éliminant l'argument de la subordination nutritive pour ne conserver, comme preuve de la régression du plaste que les faits dynamiques et expérimentaux.

Et si nous avons insisté quelque peu sur le sens de l'évolution morphologique des Chlorophytes, c'est uniquement, pour nous permettre d'établir le sens de l'évolution physiologique.

L'évolution physiologique.

Nous avons jusqu'ici envisagé les caractères physiologiques des organismes d'une manière statique. Nous nous proposons dans ce chapitre d'établir l'existence dans la série évolutive Chlorophytes → Protozoaires d'une dégradation physiologique.

Nous appelons dégradation physiologique le passage d'une potentialité donnée de synthèse à une potentialité moindre. Cette dégradation peut être qualitative ou quantitative c'est-à-dire consister dans la diminution ou la disparition d'une fonction.

La synthèse des acides aminés constitutifs des protéines se faisant à partir de groupements NH_2 , nous pouvons classer ainsi

les diverses sources azotées d'après leur valeur nutritive : NO_3 , NH_3 , $\text{R.NH}_2.\text{COOH}$ (1).

Or, si nous considérons comparativement l'évolution morphologique Chlorophytes $\rightarrow$ Leucophytes $\rightarrow$ Protozoaires et les besoins azotés des organismes, nous constatons : que les organismes primitifs, les Chlorophytes, possèdent la propriété d'utiliser les nitrates, — que les Leucophytes ont perdu le pouvoir de faire leurs synthèses azotées à partir des nitrates et qu'il leur faut, soit des sels d'ammonium, soit des acides aminés, — que les Protozoaires ont besoin de polypeptides complexes et ne peuvent vivre aux dépens d'acides aminés ou de mélanges d'acides aminés. Certains Leucophytes comme la race physiologique stable d'*Euglena gracilis* à l'obscurité possèdent les mêmes exigences que les Protozoaires. Ces organismes n'effectuent pas la synthèse des acides aminés fondamentaux.

Nous pouvons même constater des variations à l'intérieur d'une espèce : la majorité des souches de *Polytoma uwelli* possèdent le pouvoir d'utiliser les sels d'ammonium ; cependant, sur 15 souches, PRINGSHEIM et MAINX en ont trouvé une qui ne pouvait se développer qu'aux dépens des acides aminés.

(1) Du fait, aujourd'hui bien démontré, que les acides aminés fournis à un organisme sont préalablement désaminés et que c'est aux dépens de l' NH_3 ainsi formé que seront construits les acides aminés constitutifs des protéides, de nombreux auteurs, ont tiré la conclusion que les sels d'ammonium étaient supérieurs, comme aliment azoté aux amino-acides (voir à ce sujet, BACH, 1925).

Effectivement, dans un mélange azote ammoniacal + azote aminé, l'ion ammoniacal est consommé de préférence. Mais, par contre, dans un mélange azote nitrique + azote ammoniacal, l'ion nitrique peut être consommé presque aussi vite que l'ion ammoniacal. La réduction de NO_3 en NH_3 demande cependant de l'énergie.

D'ailleurs, tous les Protistes procaryotes ou eucaryotes qui assimilent les sels d'ammonium peuvent se nourrir aux dépens d'acides aminés, alors que certains Procaryotes, souches de paratyphique A, de bacille de Shiga (voir p. 104), ou Eucaryotes, souche de *Polytoma uwelli*, *Chlamydomonas* et *Hæmatococcus* à l'obscurité, ne peuvent vivre aux dépens de sels d'ammonium. Un aliment azoté organique acide aminé — leur est indispensable. De plus, nous avons vu que chez *Polytoma*, l'effet « bios » ne s'observe que lorsque l'aliment azoté est un sel d'ammonium et non lorsqu'il est représenté par un acide aminé.

Nous concluons de tout ceci que les acides aminés constituent un aliment supérieur aux sels d'ammonium.

D'autre part, ces différences du pouvoir de synthèse des corps azotés ne sont pas obligatoirement liées à la disparition de la chlorophylle et du plaste. Parmi les Eugléniens, *Euglena gracilis* peut assimiler les nitrates, caractère primitif. Mais lorsque l'aliment azoté est un nitrate, la culture est lente et pauvre, alors qu'elle est très riche si la source azotée est un sel d'ammonium. *Il y a donc, chez Euglena gracilis, diminution du pouvoir de réduire les nitrates.* D'autres Euglènes vertes ne peuvent utiliser ni les nitrates, ni les sels d'ammonium, mais ont besoin d'un acide aminé. Certains Eucaryotes enfin réclament des polypeptides complexes, ce sont les Protozoaires.

Un autre type de dégradation physiologique est celui que présentent les Trypanosomides, Flagellés parasites qui ont besoin, en plus des composés azotés nécessaires aux autres Protozoaires, de fer actif à fonction peroxydasique.

Les organismes primitifs, qui ont la possibilité de se nourrir aux dépens des nitrates (source azotée), peuvent utiliser parfaitement les sels d'ammonium, les acides aminés et les polypeptides complexes. Les organismes incapables d'utiliser les nitrates, mais ayant besoin de sels d'ammonium, peuvent assimiler les acides aminés et les polypeptides. Les organismes incapables d'utiliser les nitrates et les sels d'ammonium, qui peuvent se nourrir aux dépens des acides aminés, le peuvent également aux dépens des polypeptides. Enfin, les organismes ayant besoin de polypeptides sont naturellement incapables d'assimiler nitrates, sels d'ammonium et acides aminés.

La fonction qui disparaît la première est donc la possibilité de réduire les nitrates; puis disparaît celle d'utiliser les sels d'ammonium comme unique aliment azoté, puis celle de faire la synthèse des acides aminés fondamentaux. Enfin, les modifications apportées par le parasitisme sont également des pertes ou des déficiences fonctionnelles : déficience en fer à fonction peroxydasique chez les Trypanosomides.

On voit par ce qui précède que la fonction qui disparaît la première est celle qui demande le plus grand travail énergétique : réduction des nitrates.

Il est intéressant de trouver chez les Procaryotes des organismes possédant les mêmes caractères que les Eucaryotes envisagés. Mais il est impossible, étant donnée la petite taille des Bac-

téries, d'établir, comme pour les Eucaryotes, le sens de leur évolution morphologique. Dans ces conditions, il est impossible d'assigner avec certitude à tel type de Procaryote plutôt qu'à un autre un caractère primitif. Pourtant, sont certainement secondaires, les besoins particuliers des bactéries parasites, lesquels, en ce qui concerne le fer actif, sont les mêmes que ceux des Protozoaires parasites (v. p. 98).

TABLEAU MONTRANT LA DÉGRADATION PHYSIOLOGIQUE
DES MICROORGANISMES

Dégradation physiologique
→

	Nitrates	Sels d'ammonium	Acides aminés	Peptones	Peptones + substance « activante »
<i>Aspergillus</i>	+	+	+	+	+
Levures, <i>Polytoma uvella</i>	o	+	+	+	+
<i>Chlamydomonas</i> , <i>Hæmatococcus</i> à l'obs- curité	o	o	+	+	+
Protozoaires s. s.	o	o	o	+	+
Bactéries et Flagellés parasites (Trypa- nosomides)	o	o	o	o	+

Chez les Champignons, qui dérivent de Thallophytes à chlorophylle, nous pouvons considérer le pouvoir d'assimiler les nitrates comme un caractère primitif; l'absence de ce pouvoir et la nécessité de sels d'ammonium, comme un caractère secondaire. Il nous est possible enfin de considérer le besoin en SH ou en SS manifesté par le *Saprolegnia*, c'est-à-dire l'impossibilité de réduire les sulfates, comme un caractère secondaire, une perte de fonction.

Si donc nous envisageons dans leur ensemble, d'une part, les Chlorophytes et les Métaphytes et, d'une manière générale tous les organismes possédant plaste et chlorophylle, d'autre part, les Protozoaires et les Champignons, dépourvus de plaste et de chlorophylle et enfin, parmi ceux-ci les espèces parasites, nous voyons que les formes secondaires, dérivées, possèdent des potentialités physiologiques moindres que les formes souches primitives correspondantes.

L'évolution physiologique des organismes se traduit par une perte successive de fonctions. Ces pertes de fonction sont irréversibles. Cela est facile à concevoir pour la fonction liée à la chlorophylle et aux plastes. La disparition de la chlorophylle ou des plastes étant définitifs, la disparition de la fonction qui leur est liée l'est également. Mais il est possible d'arriver à une conclusion analogue pour ce qui concerne les fonctions non liées à des constituants cellulaires apparents. Une digression est ici nécessaire.

Remarques sur les ferments cellulaires.

On sait que la notion de ferment cellulaire s'est trouvée au cours de ces dernières années curieusement étendue. Rappelons tout d'abord que les généticiens considèrent les « gènes » facteurs de l'hérédité mendélienne comme des ferments. Ces gènes se retrouvent semblables à eux-mêmes dans les cellules et dans les organismes. On doit avec HAGEDOORN (1911) les considérer comme des ferments autocatalytiques capables de s'engendrer eux-mêmes, d'augmenter leur masse et de se diviser. Cette idée est, en particulier, adoptée par CAULLERY (1931) et par GUYÉNOT (1931).

Depuis KABESCHIMA (1920), la majorité des bactériologistes considèrent le « bactériophage » comme un ferment lytique particulier d'origine bactérienne(1). C'est un ferment pathogène si on l'envisage du point de vue très spécial de la conservation de

(1) L'hypothèse de l'origine bactérienne du principe lytique a été émise pour la première fois par TSWORT (*The Lancet*, t. CXIC, 1915, p. 1241).

l'espèce bactérienne. Les propriétés du bactériophage sont en effet beaucoup plus proches de celles des ferments que de celles des bactéries. Les expériences de LEGROUX et KEMAL DJEMIL (1932) sont à cet égard particulièrement démonstratives. Le bactériophage est de nature discontinue, sa taille est d'environ 30 m μ , il peut passer de la cellule-mère aux cellules-filles et de cellule malade à cellule saine par l'intermédiaire du milieu de culture où il peut se conserver très longtemps.

Par ailleurs, des auteurs comme DUGGAR et ARMSTRONG (1923) considèrent le virus de la « mosaïque » comme des ferments d'origine cellulaire. Ce sont également des ferments de nature discontinue, dont la taille est de 20 à 30 m μ . Considérant les similitudes entre les symptômes de mosaïque et les altérations que l'on constate dans les panachures des végétaux, DUGGAR et ARMSTRONG assimilent le virus des mosaïques à un *gène aberrant*. Nous noterons ici que CARREL (1925) arrive à une conclusion similaire pour le « virus » du sarcome qu'il considère comme un principe fourni par les cellules, agissant de façon spécifique et se reproduisant indéfiniment.

Enfin, certaines propriétés des bactéries sont liées à des supports matériels stables, capables de passer de bactérie à bactérie par les milieux de culture et même à travers certains filtres. Tels sont les faits de *paraagglutination* : *Bacterium coli* et des cocci isolés de l'intestin de sujets atteints de dysenterie bacillaire sont agglutinables par le sérum anti-Flexner (KUHNS et WOITHE, 1909). En cultivant *B. coli* avec des bacilles de Flexner vivants ou tués, OTTO, WINKLER et SUKIENNIKOVA (1923) rendent le *B. coli* agglutinable par le sérum anti-Flexner. ALMQUIST (1923) réalisant des cultures mixtes de bacilles typhique et dysentérique obtient des formes agglutinables par les sérums antidysentérique et antityphique. BURNET (1925) a pu transmettre la thermo-agglutinabilité d'un type microbien à un autre type microbien ne possédant pas cette propriété. L'« entraînement » peut s'accomplir entre des bactéries d'espèces différentes cultivées par exemple de part et d'autre d'une membrane de collodion ou d'une bougie Chamberland. E. et E. WOLLMAN (1925), en cultivant *Bacterium coli* en association avec du bacille paratyphique B, ont fait passer le taux d'agglutination de *B. coli* vis-à-vis du sérum antiparatyphique B de 1 pour 80 à 1 pour 1280.

Enfin, Jeanne LOMMEL (1926) a montré que l'on peut conférer à *B. coli* par culture associée avec *B. typhosus*, *B. paratyphosus* ou *B. dysenteriae* de SHIGA, le pouvoir de fermenter le saccharose.

E. et E. WOLLMAN ont proposé de désigner l'ensemble de ces phénomènes d'acquisition de propriétés nouvelles par entraînement, de « transfert » de propriétés de bactérie à bactérie, par le terme de « parahérédité ». WOLLMAN a en outre comparé les corpuscules matériels capables de passer d'une bactérie à l'autre aux gènes mendéliens.

Il est intéressant de remarquer que SCHÆN (1931) analysant le problème de la spécificité dans les processus de fermentation, arrive à la conclusion que la spécificité fonctionnelle des micro-organismes résulte d'une sélection due, non pas à l'acquisition de propriétés nouvelles, mais à la perte de certaines propriétés activantes. Par exemple, la molécule de glucose n'est jamais oxydée directement, mais subit une suite de transformations, chaque réaction étant due à un ferment particulier. On peut expérimentalement obtenir les corps intermédiaires en bloquant tel ou tel ferment. C'est ainsi que privant l'*Aspergillus* de fer, on provoque l'accumulation dans la culture d'acide citrique. Il faudrait se garder de conclure que l'*Aspergillus* a acquis la propriété de former de l'acide citrique ; il a tout simplement perdu la possibilité de l'oxyder.

Il y a, suivant la pittoresque expression de SCHÆN, pour chaque suite de réactions, un ensemble d'outils constituant l'appareillage catalytique ; si l'activité de l'un des outils est arrêtée, le corps qu'il devait transformer apparaît. Et les diverses espèces microbiennes, caractérisées par la production de tel ou tel corps, sont, d'après la conception de SCHÆN, des organismes ayant perdu tel ou tel outil, c'est-à-dire tel ou tel ferment.

Nous connaissons d'ailleurs chez les Bactéries quelques exemples de pertes irréversibles de fonctions. Le *Bacillus anthracis*, par culture en bouillon bichromaté, peut perdre définitivement le pouvoir de former des spores (CHAMBERLAND et Roux, 1883). Ces races asporogènes peuvent être entretenues pendant plusieurs années et conservent leur caractère (1).

(1) Plus de 5 ans d'après une communication orale de STAUB.

Par culture pendant un an en albumine d'œuf liquide, le bacille pyocyanique, race A, perd la propriété de former du pigment vert fluorescent en macération de viande non peptonée. Cette race nouvelle P, obtenue par GESSARD en 1892, est entretenue dans la collection de l'Institut Pasteur et conserve depuis 39 ans le caractère qui l'a définie (dernier essai 1931, communication orale de LEGROUX) (1).

Nous pouvons admettre que les pertes irréversibles de fonctions sont dues à la disparition ou à l'altération d'un ferment responsable d'une action donnée, formation d'une spore, formation d'un pigment, attaque d'un glucide, etc. (2).

L'existence de gènes tenant sous leur dépendance la formation de la chlorophylle, nous montre que certains ferments, que l'on peut appeler primordiaux, conditionnent la synthèse de groupements chimiques agissant eux-mêmes dans la cellule comme des systèmes catalytiques.

Quoi qu'il en soit, nous devons tenir compte, pour arriver à une représentation des ferments cellulaires, des travaux sur le bactériophage, sur les « virus » des mosaïques, sur le « virus » du sarcome, sur les gènes mendéliens. Les ferments cellulaires nous apparaîtront alors comme des corpuscules doués dans la cellule d'une certaine autonomie, assez stables puisque capables de se transmettre par le milieu extérieur, et même d'y séjourner très longtemps (plusieurs mois), de petite taille 20 à 30 mμ, de constitution chimique définie, quoique inconnue, puisqu'ils confèrent aux éléments dans lesquels ils vivent des propriétés spécifiques, capables d'augmenter leur masse et de se diviser ou plutôt d'induire la synthèse d'un complexe qualitativement et quantitativement équivalent. Leur activité peut être électivement bloquée. S'ils sont altérés, ou si leur reproduction est inhibée les cellules-filles seront dépourvues de la fonction correspondante.

(1) WOLFF (1907) a réussi à rendre achromogène par culture en milieu au sublimé, une souche de *Micrococcus prodigiosus*, mais cette variété achromogène n'a été repiquée que 7 fois. Il est difficile dans ces conditions de parler d'une modification définitive.

(2) Notons que GUYÉNOT admet, pour expliquer la mutabilité des gènes mendéliens, des transformations de leur constitution chimique entraînant l'acquisition de propriétés nouvelles.

Nous avons vu que la dégradation physiologique des Protozoaires et celle des microorganismes en général était irréversible. La disparition du plaste nous a fourni un exemple particulièrement saisissant de la perte définitive d'un organite cellulaire doué de continuité génétique. Si nous admettons la continuité génétique des ferments cellulaires, nous expliquons d'une manière très simple l'irréversibilité de l'évolution physiologique que nous avons constatée.

Quoi qu'il en soit, cette irréversibilité est un fait. Nous avons retrouvé ainsi l'une des lois les plus solidement établies de l'évolution (CAULLERY, 1931), la loi de son irréversibilité formulée par DOLLO.

D'autre part le parasitisme des Bactéries, des Champignons et des Protozoaires, nous apporte un exemple, nous pourrions presque dire une preuve, de la tendance orthogénétique à la dégradation physiologique que présentent les microorganismes. Le parasitisme permet la conservation d'espèces incapables, par suite de leurs exigences trophiques, de mener une vie libre. Peu importe que ce soit le parasitisme lui-même qui ait induit les déficiences fonctionnelles que nous constatons et qui se traduisent objectivement par des besoins nouveaux. Le fait important c'est la direction de l'évolution laquelle se poursuit dans le sens d'une dégradation, c'est-à-dire d'une diminution et d'une perte de fonctions. Ici encore nous retrouvons une des conclusions à laquelle sont arrivés les généticiens, et en particulier BATESON, qui considèrent l'évolution comme une simplification.

Nous sommes enfin amenés à admettre que cette dégradation physiologique doit conduire à des formes qui, ne pouvant satisfaire leurs exigences alimentaires, disparaîtront comme ont disparu au cours des périodes géologiques de nombreuses espèces animales et végétales.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

1° Il existe entre les divers Protistes eucaryotes : Chlorophytes privés de la fonction chlorophyllienne, Leucophytes, Protozoaires s. s., des différences considérables du pouvoir de synthèse. Les uns, *Polytoma uvella* (PRINGSHEIM, A. LWOFF), *Hæmatococcus pluvialis* et *Chlamydomonas agloëformis* (M. et A. LWOFF), font la synthèse de leurs constituants à partir de sels d'ammonium ou d'un seul acide aminé comme unique source azotée : mésotrophie.

2° D'autres comme *Glaucoma piriformis* sont incapables de se multiplier dans des milieux où l'aliment azoté est un sel d'ammonium, un mélange d'acides aminés ou un protide (muscle) ayant subi une digestion pepsique, trypsique et éreptique. Il leur faut des solutions de peptones complexes, résultant de l'hydrolyse ménagée, pepsique ou trypsique, de protides animaux, muscle, ou végétaux, graine d'arachide : métatrophie. *Glaucoma piriformis* absorbe les polypeptides.

3° Le Cilié *Glaucoma piriformis* est le seul Infusoire qu'on ait réussi à nourrir de substances dissoutes. Les autres Ciliés, comme les Amibes et les Flagellés possédant un cytopharynx, ont besoin d'une nourriture particulière. Nous basant sur l'exemple d'*Acanthamæba castellanii*, nous émettons l'hypothèse que les besoins alimentaires des phagotrophes, au point de vue biochimique, sont les mêmes que ceux de *Glaucoma piriformis*.

4° Les Trypanosomides sont métatrophes (M. LWOFF). Certains d'entre eux ont besoin, en plus des peptones nécessaires et suffisantes à *Glaucoma piriformis*, d'une quantité de sang variable suivant les espèces. Le sang agit grâce à la fonction peroxydasique du fer de l'hématine (M. LWOFF).

5° La « race physiologique stable » d'*Euglena gracilis*, cultivée à l'obscurité, a les mêmes besoins azotés que *Glaucoma piriformis* et que les Trypanosomides (A. LWOFF et H. DUSI).

6° Il existe une relation entre le plaste et la synthèse des composés azotés. Tous les Eucaryotes mésotrophes possèdent un

plaste sans que toutefois la présence de celui-ci conditionne nécessairement la mésotrophie. Tous les Protozoaires, dépourvus de plaste, sont métatrophes. Chez les Protistes procaryotes et chez les Champignons, la mésotrophie n'est pas liée à la présence du plaste.

7° En plus de l'aliment azoté, quelle que soit sa nature, sels d'ammonium, acide aminé, peptone, *Polytoma uvella* a besoin d'une source carbonée organique indépendante (PRINGSHEIM, A. LWOFF). Cet aliment est nécessaire même lorsque la source azotée est une peptone. Seuls peuvent servir d'aliment carboné, les acides acétique et butyrique. Les acides propionique, isobutyrique, valérianique et caproïque sont inutilisables ainsi que les acides appartenant à d'autres séries que la série grasse. Les seuls acides gras utilisables sont les acides à chaîne linéaire, renfermant moins de 5 atomes de carbone dans leur molécule et un nombre pair de groupements CH_2 .

8° En plus de l'aliment azoté, peptone, il faut fournir à la race physiologique stable d'*Euglena gracilis*, cultivée à l'obscurité, un composé organique indépendant. Les acides acétique, propionique, butyrique, valérianique et caproïque peuvent seuls servir d'aliment carboné. Les acides à nombre pair de groupements CH_2 sont plus favorables que ceux qui en renferment un nombre impair; les acides isobutyrique et diéthylacétique, ainsi que les acides appartenant à d'autres séries que la série grasse, sont inutilisables. Seuls, peuvent donc servir d'aliment carboné les acides gras à chaîne linéaire, renfermant moins de 7 atomes de carbone dans leur molécule.

9° La nécessité d'un aliment carboné organique indépendant, oxytrophie, est liée à la présence du plaste et à l'absence de chlorophylle.

10° L'oxytrophie des Leucophytes s'oppose à l'haplotrophie des Protozoaires, des Bactéries et des Champignons. A ces derniers organismes, l'aliment azoté organique, acide aminé, peptone, peut servir d'aliment carboné.

11° Chez les Bactéries et les Champignons, non plus que chez les Protozoaires, on ne connaît d'intermédiaire physiologique entre les organismes qui se contentent de sels d'ammonium ou d'un seul acide aminé comme aliment azoté et ceux qui ont besoin de peptones.

12° Une classification physiologique des microorganismes est proposée. Les grandes divisions sont basées soit sur les caractères de la nutrition azotée (Proto-, Auto-, Méso- et Métatrophie), soit sur les caractères de la nutrition carbonée (Photo-, Chimio-, Oxy-, et Haplotrophie). Les subdivisions sont définies à la fois par le caractère de la nutrition carbonée et par celui de la nutrition azotée.

13° Les Chlorophytes sont phototrophes, les Leucophytes sont oxytrophes, les Protozoaires sont haplotrophes.

14° Etant donnée l'existence d'une évolution morphologique Chlorophytes → Leucophytes → Protozoaires, on peut établir l'existence d'une évolution physiologique qui se traduit par une perte successive de fonctions. Le pouvoir d'utiliser l'azote nitrique est un caractère primitif. C'est, chez les Eucaryotes comme chez les Champignons, la fonction qui disparaît la première. L'organisme peut alors utiliser un sel d'ammonium (*Polytoma uvella*, Levures). La deuxième étape de la dégradation est la perte du pouvoir d'utiliser les sels d'ammonium et la nécessité d'un acide aminé. La dernière étape est l'impossibilité d'utiliser un seul acide aminé comme aliment azoté et le besoin d'une peptone.

15° Chez les Eucaryotes comme chez les Procaryotes et chez les Champignons, le parasitisme entraîne une perte de fonctions se traduisant par des besoins biochimiques nouveaux.

16° La dégradation physiologique, qualitative ou quantitative, est irréversible.

BIBLIOGRAPHIE

1922. ABDERHALDEN et SCHIFFMANN. — Weitere Untersuchungen über die von einzelnen Organen hervorgebrachten Substanzen mit spezifischer Wirkung. *Pfl. Arch. f. Ges. Physiol.*, t. 194, 1922, p. 206.
1921. ARTHUS (M.). — Précis de physiologie microbienne. Paris, Masson, éditeur
1925. BACH (D.). — Contribution à l'étude de la nutrition azotée de l'*Aspergillus repens* de Bary. *Thèse Fac. Sciences*, Paris, 1925.
1927. BACH (D.). — La nutrition azotée des mucorinées; assimilation de sels ammoniacaux. *C. R. Acad. Sciences*, t. 184, 1927, p. 766.
1910. BAUR (E.). — Untersuchungen über die Vererbung von Chromatophorenmerkmalen bei *Melandrium*, *Antirrhinum* und *Aquilegia*. *Zeitschr. Abst. u. Vererbungsst.*, t. 4, 1910, p. 781.
1930. BAUR (E.). — Einführung in die experimentelle Vererbungslehre. Berlin, Bornträger, 1930.
1924. BAYLISS (W. M.). — Principles of general Physiology. London, Longmans, Green et Cie, éditeurs, 1924.
1930. BÈLAR (K.). — Untersuchung der Protozoen. *Methodik der wissensch. Biol.*, t. 1, p. 735.
1909. BERLINER (E.). — Flagellatenstudien. *Arch. f. Protistenk.*, t. 15, 1909, p. 297.
1930. BERTHELOT (A.). — Milieux chimiquement définis et milieux naturels. *Bull. Soc. Chimie Biol.*, t. 12, 1930, p. 1025.
1911. BIEDERMAN. — Die Aufnahme, Verarbeitung und Assimilation der Nahrung. *Handbuch der Vergleich. Physiol. G. Fischer.*, 1911.
1930. BOISSEZON (de). — Contribution à l'étude de la biologie et de l'histophysiologie de *Culex pipiens* L. *Arch. Zool. expér. et gén.*, t. 70, 1930, p. 281.
1911. BORDET et JAUMAIN. — Sur la régénération du principe actif dans l'autolyse microbienne. *C. R. Soc. Biol.*, t. 85, 1921, p. 1095.
1925. BORDET (J.). — Le problème de l'autolyse microbienne transmissible ou du bactériophage. *Ann. Inst. Pasteur.*, t. 39, 1925, p. 717.
1931. BORDET (J.). — La lyse transmissible. *1^{er} Congrès International de Microbiologie*, t. I, p. 127, Paris, Masson éditeur, 1931.
1924. BOZLER. — Ueber die Morphologie der Ernährungsorganelle und die Physiologie des Nahrungsaufnahme bei *Paramæcium caudatum*. *Arch. Protistenk.*, t. 49, 1924, p. 163.

1925. BURNET (E.). — Actions d'entraînement entre races et espèces microbiennes. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, t. 14, 1925, p. 384.
1931. BUTTERFIELD (C. L.) et THERIAULT (E. J.). — The influence of the plankton on biochemical oxidation of organic matter. *Public Health Reports*, t. 46, 1931, p. 393.
1921. BRAUN et CAHN-BRONNER. — Die Nahrungsbedürfnisse des Paratyphus B. Bazillus; sein Wachstum und seine Eigenschaften beim Aufbau auf einfachen chemischen Verbindungen. *Centralbl. f. Bakt. Orig.*, t. 86, 1921, p. 1 et 196.
1922. BRAUN et CAHN-BRONNER. — Der Verwendungsstoffwechsel pathogenen Bakterien I et II. *Bioch. Zeitschr.*, t. 131, 1922, p. 220 et 272.
1924. BRAUN (H.) et KONDO SEIGO. — Der Verwendungsstoffwechsel des Tuberkelbacillus. *Klin. Woch.*, 1924, p. 10.
1924. BRAUN (H.), SATAMATELAKIS (A.), KONDO (S.). — Der Verwendungsstoffwechsel säurefester Bakterien II. *Bioch. Zeitschr.*, t. 145, 1924, p. 381.
1924. BRAUN (H.), STAMATELAKIS (A.), KONDO (S.) et GOLDSCHMIDT (R.). — Der Verwendungsstoffwechsel säurefester Bakterien II. *Bioch. Zeitschr.*, t. 146, 1924, p. 573.
1925. CARREL (A.). — Le principe filtrant des sarcomes de la poule produits par l'arsenic. *C. R. Soc. Biol.*, t. 93, 1925, p. 1083.
1931. CAULLERY (M.). — L'évolution. Paris, Payot, éditeur, 1931.
1925. COLAS-BELCOUR (J.) et LWOFF (A.). — L'utilisation des glucides par quelques Protozoaires. *C. R. Soc. Biol.*, t. 93, 1925, p. 1421.
1883. CHAMBERLAND et ROUX. — Sur l'atténuation de la virulence de la bactériémie charbonneuse sous l'influence de substances antiseptiques. *C. R. Acad. Sciences*, t. 96, 1883, p. 1088.
1903. CHARPENTIER (P. G.). — Recherches sur la physiologie d'une Algue verte. *Thèse Fac. Sciences Paris*, 1903.
- 1918 a. CHATTON (E.). — Présence d'un flagellé intestinal du genre *Trichomastix* dans le sang et les organes du gecko : *Tarentola mauritanica*. Cultures sur gélose au sang N. N. N. *C. R. Soc. Biol.*, t. 81, 1918, p. 343.
- 1918 b. CHATTON (E.). — Culture pure et indéfinie d'un flagellé intestinal du genre *Trichomastix* sur organes en autolyse aseptique. *C. R. Soc. Biol.*, t. 81, 1918, 346.
- 1918 c. CHATTON (E.). — La nutrition des flagellés intestinaux du genre *Trichomastix* en cultures pures. Simplifications rationnelles de la méthode de culture : les tissus coagulés. *C. R. Soc. Biol.*, t. 81, 1918, p. 774.
- 1918 d. CHATTON (E.). — Principaux facteurs physiques qui conditionnent la culture pure des flagellés intestinaux du genre *Trichomastix*. *C. R. Soc. Biol.*, t. 81, 1918, p. 714.
1920. CHATTON (E.). — Les Péridiniens parasites. *Arch. Zool. expér. et gén.*, t. 59, 1920, p. 1.

1921. CHATTON (E.). — Réversion de la scission chez les Ciliés. Réalisation d'individus distomes et polyénergides de *Glaucoma scintillans* se multipliant indéfiniment par scissiparité. *C. R. Acad. Sciences*, t. 173, 1901, p. 393.
1925. CHATTON (E.). — *Pansporella perplexa*. *Ann. Sciences Nat. Zool.*, t. 8, 1925, p. 5.
- 1923 a. CHATTON (E.) et CHATTON (M.). — La sexualité provoquée expérimentalement chez un Infusoire : *Glaucoma scintillans*. Prédominance des conditions du milieu dans son déterminisme. *C. R. Acad. Sciences*, t. 176, 1923, p. 1091.
- 1923 b. CHATTON (E.) et CHATTON (M.). — L'influence des facteurs bactériens sur la nutrition, la multiplication et la sexualité des Infusoires. *C. R. Acad. Sciences*, t. 176, 1923, p. 1262.
- 1925 a. CHATTON (E.) et CHATTON (M.). — L'action des facteurs externes sur les Infusoires. La conjugaison du *Glaucoma scintillans* déterminée par modification de la proportion des constituants d'un milieu chimiquement défini. *C. R. Acad. Sciences*, t. 180, 1925, p. 1137.
- 1925 b. CHATTON (E.) et CHATTON (M.). — L'action des facteurs externes sur les Infusoires. Le déterminisme de la formation des chaînes (dystomie) chez les *Colpidium*. *C. R. Acad. Sciences*, t. 180, p. 1225.
- 1925 c. CHATTON (E.) et CHATTON (M.). — L'action des facteurs externes sur la sexualité des Infusoires. Bactéries zygotènes et azygotènes. Zygose bactérienne et zygose saline. *C. R. Soc. Biol.*, t. 93, 1925, p. 675.
- 1925 d. CHATTON (E.) et CHATTON (M.). — L'action des facteurs externes sur les Infusoires. *Revue Suisse Zool.*, t. 32, 1925, p. 99.
- 1927 a. CHATTON (E.) et CHATTON (M.). — Sur le pouvoir cytotoxique immédiat des cultures de quelques Bactéries chromogènes. *C. R. Soc. Biol.*, t. 97, 1927, p. 289.
1929. CHATTON (E.) et CHATTON (M.). — Les conditions de la conjugaison du *Glaucoma scintillans* en cultures léthobactériennes. Action directe et spécifique de certains agents zygotènes. *C. R. Acad. Sciences*, t. 188, 1929, p. 1315.
1931. CHATTON (E.) et CHATTON (M.). — La conjugaison de *Paramœcium caudatum* déterminée expérimentalement par modification de la flore bactérienne associée. Races dites conjugantes et non conjugantes. *C. R. Acad. Sciences*, t. 193, 1931, p. 206.
1931. CHATTON (E.), LWOFF (A.) et LWOFF (M.). — L'origine infraciliaire et la genèse des trichocystes et des trichites chez les Ciliés. *C. R. Acad. Sciences*, t. 193, 1931, p. 670.
1923. CORI (G. T.). — The influence of thyroid extracts and thyroxine on the rate of multiplication of paramœcia. *Amer. Jl. of Physiol.*, t. 6, 1923, p. 295.
1926. CZURDA. — Die Reinkultur von Conjuganten. *Arch. Protistenk.*, t. 53, 1926, p. 215.

1902. DANGEARD (P. A.). — Recherches sur les Eugléniens. *Le Botaniste*, 8^e série, 1902, p. 97.
1921. DANGEARD (P. A.). — Observations sur une algue cultivée à l'obscurité depuis huit ans. *C. R. Acad. Sciences*, t. 172, 1921, p. 254.
1916. DOFLEIN (F.). — Zuckerflagellaten. *Biol. Centr.*, t. 36, 1916, p. 43.
1917. DOFLEIN (F.). — *Rhizochrysis* eine Uebergangsform unter der niederen Protozoen. *Zool. Jahrb.*, Abt. f. Morph., t. 48, 1917, p. 383.
1922. DOFLEIN (F.). — Untersuchungen über Chrysomonadinen I. *Archiv f. Protistenk.*, t. 44, 1922, p. 149.
1923. DOFLEIN (F.). — Untersuchungen über Chrysomonadinen II. *Archiv f. Protistenk.*, t. 46, 1923, p. 328.
- 1926-1929. DOFLEIN (F.) et REICHENOW (E.). — *Lehrbuch der Protozoenkunde*. G. Fischer, Iéna, 1929.
- 1930 a. DUSI Hisatake. — Les limites de la concentration en ions H pour la culture de quelques Euglènes. *C. R. Soc. Biol.*, t. 104, 1930, p. 734.
- 1930 b. DUSI (H.). — Les limites de la concentration en ions H pour la culture d'*Euglena gracilis* Klebs. *C. R. Soc. Biol.*, t. 103, 1930, p. 1184.
- 1930 c. DUSI (H.). — La nutrition autotrophe d'*Euglena gracilis* Klebs aux dépens de quelques corps azotés inorganiques. *C. R. Soc. Biol.*, t. 104, 1930, p. 662.
- 1930 d. DUSI (H.). — Pouvoir de synthèse de quelques Euglènes. Euglènes autotrophes et Euglènes hétérotrophes. *C. R. Soc. Biol.*, t. 105, 1930, p. 837.
1931. DUSI (H.). — L'assimilation des acides aminés par quelques Eugléniens. *C. R. Soc. Biol.*, t. 107, 1931, p. 1232.
1914. EFFRONT. — Les Catalyseurs biochimiques. Paris, Dunod, édit. 1914.
1920. EPSTEIN (H.). — Infektion des Nervensystems von Fischen durch Infusorien. *Arch. Russes Protistol.*, t. 5, 1920, p. 177.
1929. FAURÉ-FRÉMIET (E.), LÉON (C.), MAYER (A.) et PLANTEFOL (L.). — Recherches sur le besoin d'oxygène libre. L'oxygène et le mouvement des Paramécies. *Ann. Physiol. et Physicochimie Biol.*, t. 5, 1929, p. 633.
1903. FISCHER (A.). — Vorlesungen über Bakterien. Iéna, 1903.
1930. GLASER (R. W.) et CORIA (N. A.). — Methods for the pure culture of certain Protozoa. *Journ. of Exper. Medic.*, t. 51, 1930, p. 787.
1925. GHOSCH (E.). — On a new ciliate, *Balantidium Knowlesi* sp. nov., a cœlomic parasite in *Culicoides peregrinus*. *Parasitology*, t. 17, 1925, p. 184.
1931. GUYÉNOT (E.). — L'hérédité. L'évolution. 3 volumes, Paris, Doin.
1929. GRASSÉ (P. P.) et BOISSEZON (DE). — *Turchiniella culicis* n. g., n. sp. infusoire parasite de l'hémocœle d'un culex adulte. *Bull. Soc. Zool. France*, t. 54, 1929, p. 187.
1927. HADLEY. — Microbic dissociation. *Journ. Inf. Dis.*, t. 40, 1927, p. 1.

1930. HARDEN (A.). — The metabolism of Bacteria, in *System of Bacteriology*, London, 1930.
1926. HOPKINS (E. F.) et WANN (F. B.). — Relation of hydrogen-ion concentration to growth of *Chlorella* and to availability of iron. *Bot. Gaz.*, t. 81, 1926, p. 353.
1927. HOPKINS (E. F.) et WANN (F. B.). — Iron requirement for *Chlorella*. *Bot. Gaz.*, t. 84, 1927, p. 407.
1910. JACOBSEN. — Kulturversuche mit einigen niederen Volvocacen. *Zeits. f. Botan.*, t. 2, 1910, p. 145.
1909. JENSEN (Orla). — Die Hauptlinien des natürlichen Bakteriensystems. *Centralbl. f. Bakt. II*, t. 22, 1909, p. 305.
1921. JOLLOS (V.). — Experimentelle Protistenstudien I. *Arch. f. Protistenk.*, t. 43, 1921, p. 1.
1926. JONG (Dooren de). — Bijdrage tot de Kennis van het mineralisatieproces. Rotterdam, Nijgh et van Ditmaïs, éditeur, 1926.
- 1920 a. KABESHIMA (Tameso). — Sur un ferment d'immunité bactérioly-sant, du mécanisme d'immunité infectieuse intestinale, de la nature dudit « microbe filtrant », bactériophage de d'Hérelle. *C. R. Soc. Biol.*, t. 83, 1920, p. 219.
- 1920 b. KABESHIMA (T.). — Sur le ferment d'immunité bactérioly-sant. *C. R. Soc. Biol.*, t. 83, 1920, p. 471.
1919. KISCH (Br.). — Die Verwertbarkeit verschiedener chemischer Verbindungen als Stickstoffnahrung für einige pathogenen Bacterien. *Centr. f. Bakt. I. Orig.*, t. 82, 1919, p. 28.
1926. KLEIN (G.), EIGUER (A.) et MÜLLER (H.). — Nitratassimilation bei Schimmelpilzen. *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, t. 159, 1926, p. 201.
1928. KLEIN (G.). — Stickstoff und Schwefel Assimilation. *Handbuch der norm. u. patholog. Physiol.*, t. 5. Berlin, Springer, édit., 1928.
1912. KNIEP. — Photosynthese. *Handwörterbuch der Naturwissenschaften*, t. 7, 1912, p. 781.
1926. KOSTYTSCHEW (S.). — Lehrbuch der Pflanzenphysiologie. Berlin, Springer, édit., 1926.
1925. KOSTYTSCHEW (S.) et RYSKALTSCHUK (C.). — Les produits de fixation de l'azote atmosphérique par l'*Azotobacter agile*. *C. R. Acad. Sciences*, t. 180, 1925, p. 2070.
1926. KOSTYTSCHEW (S.) et TSWETKOWA (E.). — Ueber die Verarbeitung der Nitrate in organische Stickstoffverbindungen durch Schimmelpilze. *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, t. 111, 1920, p. 171.
1930. KUFFERATH (H.). — La culture des Algues. Edit. *La Revue algologique*, Paris, 1930.
1932. LEGROUX (R.) et KEMAL DJEMIL. — Sur la lyse transmissible. *C. R. Acad. Sciences*, t. 194, 1932, p. 319.
1926. LOMMEL (J.). — Influence du phénol, du formol et de certaines associations microbiennes sur les propriétés biochimiques du colibacille. *C. R. Soc. Biol.*, t. 95, 1926, p. 711.
1923. LWOFF (André). — Sur la nutrition des Infusoires. *C. R. Acad. Sciences*, t. 176, 1923, p. 928.

- 1924 a. LWOFF (A.). — Le pouvoir de synthèse d'un Protiste hétérotrophe, *Glaucoma piriformis*. *C. R. Soc. Biol.*, t. 91, 1924, p. 344.
- 1924 b. LWOFF (A.). — Infection expérimentale à *Glaucoma piriformis* chez *Galleria mellonella* (Lépidoptère). *C. R. Acad. Sciences*, t. 178, 1924, p. 1106.
- 1925 a. LWOFF (A.). — Sur la nutrition des Infusoires aux dépens des substances dissoutes. *C. R. Soc. Biol.*, t. 93, 1925, p. 1272.
- 1925 b. LWOFF (A.). — Influence d'extraits de glandes et d'organes sur la vitesse de multiplication des Infusoires. *C. R. Soc. Biol.*, t. 93, 1925, p. 1925.
- 1929 a. LWOFF (A.). — La nutrition de *Polytoma uvela* Ehrenberg et le pouvoir de synthèse des protistes hétérotrophes. Les protistes mésotrophes. *C. R. Acad. Sciences*, t. 188, 1929, p. 114.
- 1929 b. LWOFF (A.). — Milieux de culture et d'entretien pour *Glaucoma piriformis*. *C. R. Soc. Biol.*, t. 101, 1929, p. 635.
1930. LWOFF (A.). — Le fer, élément indispensable au Flagellé *Polytoma uvela* Ehr. *C. R. Soc. Biol.*, t. 104, 1930, p. 664.
- 1931 a. LWOFF (A.). — La nutrition carbonée de *Polytoma uvela*. *C. R. Soc. Biol.*, t. 107, 1931, p. 1070.
- 1931 b. LWOFF (A.). — Sur le pouvoir de synthèse de quelques Protistes. *1^{er} Congrès International Microbiologie*, Paris, 1930. Masson, 1931.
1929. LWOFF (A.) et DUSI (H.). — Le pouvoir de synthèse d'*Euglena gracilis* cultivée à l'obscurité. *C. R. Soc. Biol.*, t. 102, 1929, p. 567.
1931. LWOFF (A.) et DUSI (H.). — La nutrition azotée et carbonée d'*Euglena gracilis* en culture pure à l'obscurité. *C. R. Soc. Biol.*, t. 107, 1931, p. 1068.
1929. LWOFF (A.) et LWOFF (M.). — Le pouvoir de synthèse de *Chlamydomonas agloëformis* et d'*Hæmatococcus pluvialis* en culture pure à l'obscurité. *C. R. Soc. Biol.*, t. 102, 1929, p. 569.
1930. LWOFF (A.) et LWOFF (M.). — Détermination expérimentale de la synthèse massive de pigment carotinoïde par le flagellé *Hæmatococcus pluvialis* Flot. *C. R. Soc. Biol.*, t. 105, 1930, p. 454.
1926. LWOFF (A.) et ROUHELMAN (N.). — Variations de quelques formes d'azote dans une culture pure d'Infusoires. *C. R. Acad. Sciences*, t. 183, 1926, p. 156.
- 1928 a. LWOFF (Marguerite). — Action favorisante du sang sur la culture de *Leptomonas ctenocephali* Fanth. (Flagellé Trypanosomide). *C. R. Soc. Biol.*, t. 94, 1928, p. 472.
- 1928 b. LWOFF (M.). — Influence du degré d'hydrolyse des matières protéiques sur la nutrition de *Leptomonas ctenocephali* Fanth. *in vitro*. *C. R. Soc. Biol.*, t. 94, 1928, p. 240.
1929. LWOFF (M.). — Milieu d'isolement et d'entretien pour *Schizotrypanum cruzi* Chagas. *Bull. Soc. Path. exot.*, t. 22, 1929, p. 247.
- 1930 a. LWOFF (M.). — Sur la culture de *Leptomonas fasciculata* Novy, Mac Neal et Torrey, 1907, Flagellé Trypanosomide. *C. R. Soc. Biol.*, t. 104, 1930, p. 666.

- 1930 b. LWOFF (M.). — Un Flagellé parasite hétérotrophe : *Leptomonas oncopelti* Noguchi et Tilden. *C. R. Soc. Biol.*, t. 105, 1930, p. 835.
- 1931 a. LWOFF (M.). — Remarques sur la culture de quelques *Leptomonas* (Trypanosomides). *C. R. Soc. Biol.*, t. 107, 1931, p. 447.
- 1931 b. LWOFF (M.). — La nature de la substance du sang indispensable aux Trypanosomides. *C. R. Soc. Biol.*, t. 107, 1931, p. 1234.
- 1931 c. LWOFF (M.). — Culture de *Strigomonas (Leptomonas) fasciculata* (Trypanosomide) en présence de corps à fonction peroxydasique. *C. R. Soc. Biol.*, t. 107, 1931, p. 1428.
1922. MACARTHUR. — A Holotrichous ciliate pathogenic to *Theobaldia annulata* Schranck. *J. R. Army med. Corps*, t. 38, 1922, p. 83.
1927. MAINX (F.). — Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Eugleniden, I et II. *Arch. f. Protistenk.*, t. 60, 1927, p. 305 et 355.
1929. MAINX (F.). — Biologie der Algen. *Tabulæ Biologiæ*, t. 5, 1929, p. 1.
1902. MATRUCHOT (L.) et MOLLIARD (M.). — Variations de structure d'une algue verte sous l'influence du milieu nutritif. *Rev. gén. Bot.*, t. 14, 1902, p. 193.
1923. MERCIER et POISSON. — Un cas de parasitisme accidentel d'une Nèpe par un Infusoire. *C. R. Acad. Sciences*, t. 176, 1923, p. 1838.
1903. MESNIL (F.) et MOUTON (H.). — Sur une diastase protéolytique extraite des infusoires ciliés. *C. R. Soc. Biol.*, t. 55, 1903, p. 1016.
1929. MILKOVITCH (G.). — Action du sérum humain sur un infusoire *Glaucoma piriiformis*. *C. R. Soc. Biol.*, t. 100, 1929, p. 417.
1931. MILKOVITCH (G.). — Action du sérum humain sur un Infusoire. *Bull. Biol. France Belgique*, t. 65, 1931, p. 103.
1925. MOLLIARD (M.). — Nutrition de la Plante, t. 1 à 4. Paris, Doin, 1925.
1902. MOUTON (H.). — Recherches sur la digestion chez les Amibes et sur leur diastase intracellulaire. *Thèse Fac. Sciences Paris*, 1902 et *Ann. Inst. Pasteur*, t. 16, p. 457.
1928. NEUBAUER (O.). — Intermediäre Eiweisstoffwechsel. *Handbuch der normal u. patholog. Physiologie*, t. 5, 1928.
1908. NOWIKOFF. — Ueber die Wirkung des Schilddrüsenextrakts und einige anderer Organstoffe auf Ciliaten. *Arch. f. Protistenk.*, t. 11, 1908, p. 30.
1916. ŒHLER (R.). — Amöbenzucht auf reinem Boden. *Archiv f. Protistenk.*, t. 37, 1916, p. 175.
1919. ŒHLER (R.). — Flagellaten und Ciliatenzucht auf reinem Boden. *Arch. f. Protistenk.*, t. 40, 1919, p. 16.
1920. ŒHLER (R.). — Gereinigte Ciliatenzucht. *Archiv f. Protistenk.*, t. 41, 1920, p. 34.
- 1924 a. ŒHLER (R.). — Weitere Mitteilungen über gereinigte Amöben und Ciliatenzucht. *Archiv f. Protistenk.*, t. 49, 1924, p. 112.
- 1924 b. ŒHLER (R.). — Gereinigte Zucht von freilebenden Amöben, Flagellaten und Ciliaten. *Archiv f. Protistenk.*, t. 49, 1924, p. 287.

1893. OGATA (M.). — Ueber die Reinkultur gewisser Protozoen. *Zentralbl. f. Bakt.*, t. 14, 1893, p. 165.
1923. OTTO, WINKLER et SUKIENNIKOVA. — Bacteriophages, Lysin und Paraagglutination. *Zeitschr. f. Hyg.*, t. 101, 1923, p. 119.
- 1916 a. PASCHER (A.). — Zur Auffassung der farblosen Flagellatenreihen. *Ber. Deut. Bot. Ges.*, t. 34, 1916, p. 440.
- 1916 b. PASCHER (A.). — Studien über die rhizopodiale Entwicklung der Flagellaten. *Arch. f. Protistenk.*, t. 36, 1916, p. 81.
1917. PASCHER (A.). — Flagellaten und Rhizopoden in ihren gegenseitigen Beziehungen. *Arch. f. Protistenk.*, t. 38, 1917, p. 1.
1918. PASCHER (A.). — Von einer allen Algenreihen gemeinsamen Entwicklungsregel. *Ber. Deut. Bot. Ges.*, t. 36, 1918, p. 390.
1925. PASCHER (A.). — Die braune Algenreihe der Chrysomonadinen. *Arch. f. Protistenk.*, t. 52, 1925, p. 489.
1930. PASCHER (A.). — Eine neue, stigmatisierte und phototaktische Amöbe. *Biolog. Zentralbl.*, t. 50, 1930, p. 1.
1858. PASTEUR (L.). — Nouveaux faits concernant l'histoire de la fermentation alcoolique. *C. R. Acad. Sciences*, t. 47, 1858, p. 1011.
- 1860 a. PASTEUR (L.). — Mémoire sur la fermentation alcoolique. *Ann. Chimie et Physique*, t. 58, 1860, p. 323.
- 1860 b. PASTEUR (L.). — Recherches sur le mode de nutrition des Mucorinées. *C. R. Acad. Sciences*, t. 51, 1860, p. 709.
1922. PÉNARD. — Etude sur les infusoires d'eau douce. Genève, 1922.
1921. PETERS (R. A.). — The substances needed for the growth of a pure culture of *Colpidium colpoda*. *Journ. of Physiol.*, t. 55, 1921, p. 1.
1928. PETERS (R. A.). — A synthetic medium (article Protozoa). *The Microtommists vade-mecum*, 9^e édition. London, 1928, Churchill, édit.
1928. PIRELL-GOODRICH (H.). — Protozoa (*in the Microtommists vade-mecum*, 9^e édition), London, 1928, Churchill, édit.
1921. PRINGSHEIM (E. G.). — Zur Physiologie saprophytischen Flagellaten (*Polytoma*, *Astasia* und *Chilomonas*). *Beit. z. Allg. Botanik*, t. 2, 1921, p. 88.
1926. PRINGSHEIM (E. G.) et MAINX (F.). — Untersuchungen an *Polytoma uvella* Ehr. insbesondere über Beziehungen zwischen chemotactischen Reizwirkung und chemischer Konstitution. *Planta Archiv f. wissens. Bot.*, t. 1, 1926, p. 583.
1913. RAVIN (P.). — Nutrition carbonée des plantes à l'aide des acides organiques libres et combinés. *Ann. Sc. Nat., Bot.*, sér. 9, t. 28, 1913, p. 289.
1870. RAULIN (J.). — Etudes chimiques sur la végétation. *Thèse Fac. Sciences Paris*, 1870. Réédition, Masson, 1905.
- 1926-29. REICHENOW (E.) v. DOFLEIN et REICHENOW.
1927. SCHERFFEL. — Beitrag zur Kenntnis der Chrysomonadinen. *Archiv f. Protistenk.*, t. 57, 1927, p. 331.
1914. SCHUMWAY. — Effect of thyroid on division rate of *Paramæcium*. *Jl. exper. Zool.*, t. 57, 1914, p. 297.

1917. SCHUMWAY. — The effects of thyroïd diet upon *Paramœcium*. *Jl. exper. Zool.*, t. 22, 1917, p. 529.
1931. SCHÖN (M.). — Problèmes de spécificité dans les processus de fermentation. *Ann. Inst. Pasteur*, t. 47, 1931, p. 690.
1924. TREILLARD (M.) et LWOFF (A.). — Sur un infusoire parasite de la cavité générale des larves de Chironomes. Sa sexualité. *C. R. Acad. Sciences*, t. 178, 1924, p. 1761.
1924. ULLRICH (H.). — Die Rolle der Chloroplasten in der Eiweisbildung in den grünen Pflanzen. *Zeit. f. Botan.*, t. 16, 1924, p. 513.
1925. USPENSKI (E. E.) et USPENSKAJA (W. J.). — Reinkultur und Ungeschlechtliche Fortpflanzung des *Volvox minor* und *Volvox globator* in einer synthetischen Nährlösung. *Zeit. f. Botan.*, t. 17, 1925, p. 308.
- 1930 a. VOLKONSKY (M.). — Les constituants cytoplasmiques de *Polytoma uvella* Ehr. Existence d'un leucoplaste. *C. R. Soc. Biol.*, t. 105, 1930, p. 619.
- 1930 b. VOLKONSKY (M.). — Les substances de réserve figurées de *Polytoma uvella*. Étude descriptive et expérimentale. *C. R. Soc. Biol.*, t. 105, 1930, p. 624.
- 1930 c. VOLKONSKY (M.). — Les variations du plaste de *Polytoma uvella* et son rôle dans l'assimilation azotée. *C. R. Soc. Biol.*, t. 105, 1930, p. 680.
1931. VOLKONSKY (M.). — *Hartmannella castellanii* DOUGLAS et la classification des Hartmannelles (*Hartmannellinae* nov. subfam., *Acanthamæba* nov. gen., *Glæseria* nov. gen.). *Arch. Zool. expér. et gén. (Protistologica)*, t. 72, 1931, p. 317.
- 1932 a. VOLKONSKY (M.). — Culture de *Saprolegnia* sp. en milieu synthétique. Son alimentation sulfurée. *C. R. Soc. Biol.*, t. 109, 1932, p. 528.
- 1932 b. VOLKONSKY (M.). — Utilisation de différentes combinaisons du soufre par *Saprolegnia* sp. *C. R. Soc. Biol.*, t. 109, 1932.
1926. WENTON (C. M.). — *Protozoology*. London, Baillière, Tindall et Cox, éditeurs.
1931. WINOGRADSKY. — Analyse microbiologique du sol. *1er Congrès Int. Microbiologie*, Paris 1931, Masson éditeur.
1907. WOLFF (J.). — Über Modifikationen und experimentelle ausgelöste Mutationen von *Bacillus prodigiosus* und anderen Schizophyten. *Zeitschr. f. Indukt. Abst. u. Vererb.*, t. 2, 1909, p. 90.
- 1925-27. WOLLMAN (Eugène). — Recherches sur le bactériophage I et II. *Ann. Inst. Pasteur*, t. 39, 1925, p. 789, et t. 41, 1927, p. 883.
1928. WOLLMAN (E.). — Bactériophagie et processus similaires. Hérité ou infection? *Bull. Inst. Pasteur*, t. 26, 1928, p. 1 et 49.
1925. WOLLMAN (Eugène) et WOLLMAN (Elisabeth). — Sur la transmission parahéréditaire des caractères chez les bactéries. *C. R. Soc. Biol.*, t. 93, 1925, p. 1568.

1921. WOODCOCK et LODGE. — Natural history report : Protozoa. *British Antarctic (Terra Nova) Expedition*, 1910, t. 6, 1921, p. 7.
1924. WOODRUFF (L. L.) et SWINGLE (W. W.). — The effects of thyroïd and some other endocrine products in *Paramæcium*. *Amer. Jl. of Physiol.*, t. 69, 1924, p. 21.
1921. WURMSER (R.). — Recherches sur l'assimilation chlorophyllienne. *Arch. Phys. biolog.*, t. 1, 1921, p. 33.
1930. WURMSER (R.). — Oxydations et Réductions. Presses Universitaires de France. Paris, 1930.
1923. ZOTTA (G.). — Observations sur la biologie du *Leptomonas pyrrhocris* dans divers milieux de culture. *Ann. scient. Univ. Jassy*, t. 12, 1923, p. 35.
1899. ZUMSTEIN (H.). — Zur Morphologie und Physiologie der *Euglena gracilis* Klebs. *Thèse Leipzig*, 1899.
-

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

- 1° Théories relatives à la nature du bactériophage.
- 2° Les virus des mosaïques.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 16 février 1932.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

CH. MAURAIN.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Pour le Recteur,

L'inspecteur d'Académie,

J. PERRON.

SORTI DES PRESSES DE
L'IMPRIMERIE BARNÉOUD

== A LAVAL ==

